

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maruša KERSNIK

**FERMENTACIJSKE LASTNOSTI IZOLATA
AVTOHTONIH KVASOVK PRI ALKOHOLNI
FERMENTACIJI SORTE RENSKI RIZLING**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maruša KERSNIK

**FERMENTACIJSKE LASTNOSTI IZOLATA AVTOHTONIH
KVASOVK PRI ALKOHOLNI FERMENTACIJI SORTE RENSKI
RIZLING**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FERMENTATION CHARACTERISTICS OF AUTOCHTHONOUS
YEAST ISOLATE FOR ALCOHOLIC FERMENTATION OF RHINE
RIESLING**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Diplomsko delo je bilo opravljeno v laboratoriju za vinarstvo Katedre za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Mojmir Wondra in za recenzentko prof. dr. Lea Pogačnik.

Mentor: doc. dr. Mojmir Wondra

Recenzentka: prof. dr. Lea Pogačnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maruša Kersnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 663.221:663.252.3/.4:543.2/.9(043)=163.6
- KG mošt/ vino/ Renski rizling/ vinske kvasovke/ alkoholna fermentacija/ temperatura fermentacije/ izolat avtohtonih kvasovk/ *Saccharomyces cerevisiae*/ fizikalnokemijske lastnosti
- AV KERSNIK, Maruša
- SA WONDRA, Mojmir (mentor)/ POGAČNIK, Lea (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2016
- IN FERMENTACIJSKE LASTNOSTI IZOLATA AVTOHTONIH KVASOVK PRI ALKOHOLNI FERMENTACIJI SORTE RENSKI RIZLING
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 48 str., 4 pregl., 14 sl., 2 pril., 27 vir.
- IJ sl
- Jl sl/en
- AI Namen diplomske naloge je ugotoviti, kako dodatek izolata avtohtonih kvasovk vpliva na potek fermentacije in kakovost vina renski rizling v primerjavi z avtohtono mikrofloro ter kakšen vpliv ima pri tem temperatura fermentacije. Za poskus je bil uporabljen mošt renskega rizlinga iz vinorodnega podkoliša Srednje Slovenske gorice. Opravili smo osnovne fizikalno-kemijske analize vzorca mošta terga razdelili v šest 35-litrskih fermentacijskih tankov in štiri 0,5-litrške fermentacijske steklenice. V štiri tanke in dve fermentacijski steklenici smo moštu dodali izolat avtohtonih kvasovk, v ostalih pa pustili le avtohtono mikrofloro. Poskus smo izvajali pri dveh temperaturah fermentacije, 15 °C in 20 °C. Po končani alkoholni fermentaciji (AF) smo v vzorcih mladega vina opravili naslednje analize: pH, skupne (titrabilne) kisline, relativno gostoto, ekstrakt in alkohol, reducirajoče sladkorje, SO₂, hlapne kisline in fenolne spojine. V fermentacijskih steklenicah smo s tehtanjem spremljali izgube CO₂ med potekom alkoholne fermentacije. AF z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk je pri 20 °C potekla hitreje kot pri vzorcih, ki so fermentirali pri 15 °C, in pri vzorcih brez dodanih kvasovk. V mladem vinu je po AF brez dodatka kvasovk mnogo večji ostanek nepovretega sladkorja, to je tudi razlog za manjšo alkoholno stopnjo v primerjavi z vzorci z dodanim izolatom kvasovk. Koncentracija hlapnih kislin, fenolnih spojin in skupnega SO₂ je bila v vzorcih, ki so fermentirali z dodanim izolatom pri 20 °C, občutno manjša kot pri ostalih vzorcih. Tudi senzorično so se mlada vina močno razlikovala med sabo, najbolj zaradi razlike v sladkorni stopnji, ki je vina razdelila v različne kategorije vse od suhega do sladkega vina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC UDC 663.221:663.252.3/.4:543.2/.9(043)=163.6
- CX must/ wine/ Rhine Riesling/ wine yeasts/ alcoholic fermentation/ fermentation temperature/ autochthonous yeast isolate/ *Saccharomyces cerevisiae*/ physico-chemical properties
- AU KERSNIK, Maruša
- AA WONDRA, Mojmir (supervisor)/ POGAČNIK, Lea (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2016
- TY FERMENTATION CHARACTERISTICS OF AUTOCHTHONOUS YEAST ISOLATE FOR ALCOHOLIC FERMENTATION OF RHINE RIESLING
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 48 p., 4 tab., 14 fig., 2 ann., 27 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The aim of the graduation thesis was to investigate the impact of the autochthonous yeast isolate (AYI) and the influence of the fermentation temperature (FT) on the fermentation process and the quality of Rhine Riesling wine compared to the natural yeast flora. In the experiment Rhine Riesling must from the wine growing district of Srednje Slovenske gorice was used. A basic physico-chemical analysis of the must was performed and the must was divided into six 35-liter fermentation tanks and four 0.5-liter fermentation bottles. In four tanks and two fermentation bottles the AYI was added to the must, while only natural yeast flora was used in the rest of the must. The experiment was set up at two different FT, 15 °C and 20 °C. After the completion of alcoholic fermentation (AF) the following analyses of the young wine were conducted: pH, total (titratable) acids, relative density, extract and alcohol, reducing sugars, SO₂, volatile acids and phenolic compounds. The fermentation bottles were weighed to monitor the loss of CO₂ during the AF. The AF in the must with the addition of the AYI occurring at 20 °C finished faster than in the must fermented at 15 °C and in the must without the addition of the AYI. The young wines in which the AF occurred without the addition of yeast had higher residual sugar values, which is also the reason for the lower alcohol content in comparison to the ones with added AYI. The concentration of volatile acids, phenolic compounds and total SO₂ in the wines which had fermented with the addition of AYI at 20 °C was significantly lower than in the other wines. The observations of sensory analyses of the young wines varied greatly, the biggest difference being in the sugar level, which divided the wines into different categories ranging from dry to sweet wine.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
SIMBOLI IN OKRAJŠAVE.....	11
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI NALOGE.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 VINORODNI PODOKOLIŠ SREDNJE SLOVENSKE GORICE.....	3
2.1.1 Bioklimatski pogoji.....	3
2.2 OPIS SORTE RENSKI RIZLING.....	4
2.2.1 Tuja imena.....	4
2.2.2 Poreklo in razširjenost.....	4
2.2.3 Botanični opis grozda in jagode.....	4
2.2.4 Senzorični opis sorte.....	5
2.3 VINSKE KVASOVKE.....	5
2.4 KEMIJSKA SESTAVA MOŠTA IN VINA.....	8
2.4.1 Alkoholi.....	8
2.4.2 Organske kisline.....	9
2.4.3 Mineralne snovi.....	11
2.4.4 Dušikove spojine.....	11
2.4.5 Fenoli.....	11
2.4.6 Estri in acetaldehid.....	12
2.4.7 Sladkorji.....	12
2.4.8 Vitamini.....	12

2.5 ALKOHOLNA FERMENTACIJA	13
2.6 AROMA VINA.....	14
2.7 KAKOVOSTNI PARAMETRI VINA	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 MATERIAL.....	16
3.1.1 Mošt	16
3.1.2 Izolat avtohtonih kvasovk	16
3.1.3 Pribor in oprema	16
3.2 METODE DELA	16
3.2.1 Potek poskusa	16
3.2.2 Nastavitev fermentacijskega poskusa	18
3.2.2.1 Nastavitev fermentacijskega poskusa v tankih	18
3.2.2.2 Nastavitev poskusa v fermentacijskih steklenicah.....	18
3.2.3 Fizikalno-kemijske analize mošta	18
3.2.3.1 Vsebnost sladkorjev	18
3.2.3.2 pH mošta	18
3.2.3.3 Skupne in titrabilne kisline v moštu.....	19
3.2.4 Vrelne steklenice in fermentacijska krivulja	20
3.2.5 Fizikalno-kemijske analize vina	20
3.2.5.1 Določanje pH mladega vina.....	20
3.2.5.2 Določanje skupnih in titrabilnih kislin v mladem vinu.....	20
3.2.5.3 Določanje reducirajočih sladkorjev	20
3.2.5.4 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola	21
3.2.5.5 Določanje sladkorja prostega ekstrakta	22
3.2.5.6 Določanje hlapnih kislin	22
3.2.5.7 Določanje fenolnih spojin v vinu.....	23
3.2.5.8 Določanje žveplovega dioksida	23
3.2.6 Senzorična analiza vina	24
3.2.7 Statistična analiza	25
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	26
4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA.....	26

4.2 REZULTATI ANALIZ MLADEGA VINA.....	26
4.2.1 pH mladega vina	26
4.2.2 Skupne in titrabilne kisline.....	28
4.2.3 Reducirajoči sladkorji.....	29
4.2.4 Relativna gostota, ekstrakt in alkohol	30
4.2.5 Sladkorja prosti ekstrakt	32
4.2.6 Hlapne kisline.....	33
4.2.7 Fenolne spojine	34
4.2.8 Skupni žveplov dioksid.....	36
4.3 FERMENTACIJSKE STEKLENICE.....	37
4.4 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE	38
4.5 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE	40
5 SKLEPI.....	42
6 POVZETEK	44
7 VIRI.....	46
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sladkorna stopnja, pH ter koncentracija titrabilnih (TK ₁) in skupnih (TK ₂) kislin v moštu.....	26
Preglednica 2: Skupni suhi ekstrakt (SE)	32
Preglednica 3: Sladkorja prosti ekstrakt (SPE)	32
Preglednica 4: Statistična analiza vpliva temperature fermentacije in uporabo izolata avtohtone kvasovke ali naravno prisotne mikroflore na fizikalno-kemijske parametre mladega vina.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski potek poskusa	17
Slika 2: Vrednosti pH v vzorcih mladega vina	27
Slika 3: Primerjava pH vrednosti mošta in mladega vina	27
Slika 4: Skupne (TK ₂) in titrabilne (TK ₁) kisline v mladem vinu.....	28
Slika 5: Koncentracije reducirajočih sladkorjev v vzorcih mladega vina.....	29
Slika 6: Relativne gostote vzorcev vina in njihovih destilatov	30
Slika 7: Vsebnost alkohola v vzorcih mladega vina	31
Slika 8: Masne koncentracije hlapnih kislin, izražene kot očetna kislina.....	33
Slika 9: Umeritvena krivulja za izračun fenolnih spojin za vzorca 1 in 2	34
Slika 10: Umeritvena krivulja za izračun fenolnih spojin za vzorce 3, 4, 5 in 6	34
Slika 11: Koncentracija fenolnih spojin v vzorcih mladega vina.....	35
Slika 12: Koncentracije skupnega SO ₂ v vzorcih mladega vina	36
Slika 13: Sprememba mase fermentacijskih steklenic med alkoholno fermentacijo	37
Slika 14: Masa sproščenega CO ₂ v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije	38

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izračun masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) iz relativne gostote d_{SE} pri 20°C (Košmerl in Kač, 2007: 43)

Priloga B: Standardne raztopine galne kisline za pripravo umeritvene krivulje (Košmerl in Kač, 2007: 98)

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

AF	alkoholna fermentacija
CFU	kolonijska enota (ang. colony forming unit)
F.C.	Folin-Ciocalteujev reagent
JV	jugovzhod
PGO	deželna vina s priznano geografsko oznako
SE	skupni suhi ekstrakt
SPE	sladkorja prosti ekstrakt
SV	severovzhod
ZPG	kakovostna in vrhunska vina z zaščitenim geografskim poreklom

1 UVOD

Iz grozdja žlahtne vinske trte lahko pripravimo mošt, ki z mikrobiološkim procesom, imenovanim alkoholna fermentacija (AF), postane vino (Bavčar, 2006). Ta proces vodijo kvasovke različnih vrst, ki se nahajajo na grozdni jagodi in jih v grobem razdelimo v skupini *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* kvasovk (Zabukovec in sod., 2015).

Kvasovke porabljajo sladkorje iz mošta kot vir energije in v anaerobnih pogojih kot produkt izločajo etanol in CO₂ (Moreno in Peinado, 2012). V moštu so v večjem številu prisotne vrste ne-*Saccharomyces*, po nekaj dneh AF pa začnejo prevladovati vrste *Saccharomyces*, predvsem *S. cerevisiae* (Zabukovec in sod., 2015). Do tega pride, ker so populacije ne-*Saccharomyces* kvasovk občutljive na prisotnost etanola, ki nastaja kot produkt AF, in zato po nekaj dneh fermentacije odmrejo. Kvasovke *S. cerevisiae* so za etanol odpornejše in kljub njihovi majhni prisotnosti v začetni mikroflori že po nekaj dneh dosežejo prevlado nad drugimi vrstami ter zaključijo AF (Manzanares in sod., 2011).

Za uspešno AF je zaželeno, da kvasovke AF hitro začnejo, da imajo dobro toleranco do etanola in SO₂, da prenesejo fermentacijo pri nizkih in visokih temperaturah ter da ne proizvajajo vodikovega sulfida ali drugih snovi, ki bi lahko negativno vplivale na kakovost. Te lastnosti so značilne za *S. cerevisiae*, zato se ta vrsta večkrat uporablja za inokulacijo mošta (Bavčar, 2006).

Na končno kakovost vina najbolj vpliva poreklo, kakovost letnika, čas in način trgatve ter predelava grozdja, ki se odraža v kemijski sestavi soka (Šikovec, 1996). Samo grozdje prispeva k primarni aromi vina. Z delovanjem kvasovk med AF poleg glavnih metaboličnih produktov etanola in CO₂ nastajajo v vinu tudi drugi stranski produkti, kot so glicerol, višji alkoholi in estri, ki doprinesejo k sekundarni ali takoimenovani fermentacijski aromi. Poznamo tudi terciarno aromo, ki je posledica zorenja vina (Manzanares in sod., 2011).

Za naš poskus smo uporabili mošt iz podkoliša Srednje Slovenske gorice. Podkoliš je poznan po kakovostnih renskih rizlingih in mnogi so prepričani, da so ravno ugodna mikroflora in bioklimatski pogoji odločilni za sortno značilnost tega vina. Na željo nekaterih vinarjev smo zato izolirali sev vinskih kvasovk in ga dodali grozdnemu moštu z namenom favoriziranja AF in poudarjanja sortne izraženosti.

1.1 CILJI NALOGE

Cilj naloge je ugotoviti, kako dodatek izolata avtohtonih kvasovk in temperatura fermentacije vplivata na potek fermentacije in kakovost vina renski rizling v primerjavi z avtohtono mikrofloro.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljamo, da fermentacija z dodatkom kvasnega izolata daje boljšo kemijsko sestavo in boljše senzorične lastnosti vina kot fermentacija z avtohtono mikrofloro ter da bo fermentacija pri višji temperaturi potekla hitreje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINORODNI PODOKOLIŠ SREDNJE SLOVENSKE GORICE

Vinorodni podokoliš Srednje Slovenske gorice se nahaja v okolišu Štajerska Slovenija, ki je del vinorodne dežele Podravje (Pravilnik o seznamu ..., 2007). Leži severno od Haloz in v svoji skrajni JV točki doseže Veliko Nedeljo. Nahaja se na levem bregu reke Drave, na SV ga omejuje reka Ščavnica. Pokrajina je gričevnata in daje videz rahle valovitosti. Griči so nizki in ne preveč strmi, med njimi teče reka Pesnica, ki daje Srednjim Slovenskim goricam dovolj vode za gojenje zahtevnejših kmetijskih kultur. Poznane so številne vinogradniške lege, ki dajejo kakovostna vina belih sort, od Renskega in Laškega rizlinga pa do Sauvignona, Chardonnaya, Zelene silvanca in Rumene muškata (Skaza, 1994).

Različne sorte se različno odzovejo na ekološke razmere, zato morajo vinogradniki upoštevati prilagodljivost sort in izbrati tiste, ki dajejo v danih pogojih najboljše rezultate. Najprimernejše sorte za posamezne okoliše so predpisane s trsnim izborom in razdeljene na priporočene in dovoljene (Rajher, 1994). Vinorodnega okoliša Srednje Slovenske gorice se je dolgo časa držal slab sloves zaradi samorodnic, a je z obnovo kakovostnih leg s kakovostnimi sortami Laškega in Renskega rizlinga ter Sauvignona in Šipona uspel uveljaviti sloves kakovostnega vinorodnega območja (Šikovec, 1996).

2.1.1 Bioklimatski pogoji

Vinska trta potrebuje za uspešno rast srednjo letno temperaturo med 9 °C in 12 °C. Bližina gozdov in večjih vodnih površin blaži prevelika klimatska nihanja, kar je za trto ugodno. Najprimernejše za gojenje so peščene in glinaste ilovice, peščena tla so manj primerna zaradi suše in večjega izpiranja organskih in mineralnih snovi. Optimalna letna količina padavin je med 600 mm in 800 mm (Žiberna, 1992).

Geološka podlaga vpliva na vrsto tal in od tega je močno odvisen značaj vina. Srednje Slovenske gorice so na terciarnih mehkih karbonatnih kamninah, prevladuje pesek, prod in glina. Tla na mehkih karbonatih dajejo po okusu polna in s cvetico bogata vina (Šikovec, 1996).

Podnebje Srednjih Slovenskih goric je podobno kot v Halozah. Omiljeno alpsko in panonsko podnebje se tu srečujeta in kombinirata v za vinsko trto idealno prehodno klimo, značilno za severne vinorodne pokrajine, kot sta Burgundija in Porenje (Skaza, 1994). Severna vinogradniška pridelovalna območja so primerna za pridelavo kakovostnih, lažjih in zaradi večjih kislin osvežujočih belih vin, ki imajo prijetno cvetico (Šikovec, 1996).

Vinogradi so omejeni na termalni pas, pomembna je ekspozicija in relativna višina pa tudi naklon. V času vegetacije je v termalnem pasu sončno obsevanje za 20 ur daljše kot v nižinskem pasu. Vinogradniške površine JZ leg so v naklonih med 11° - 15°, na JV in južnih legah pa je največ vinogradov v naklonu 6°-10° (Žiberna, 1992).

2.2 OPIS SORTE RENSKI RIZLING

2.2.1 Tuja imena

Renski rizling je v svetu poznan pod različnimi imeni. V Nemčiji ga najdemo pod imeni Riesling, Johannisberg, Rheinrisling, v Italiji kot Riesling Renano, na Slovaškem se imenuje Rohac, v ZDA in Kanadi pa White riesling (Nemanič, 2006)

2.2.2 Poreklo in razširjenost

Po poreklu izhaja sorta Renski rizling iz renske divje trte. Njeno ime opisuje sortno lastnost osipanja med cvetenjem. Najboljšo kakovost daje rizling iz dežel ob Renu, v Alzaciji in Wachauu. Sorta je razširjena tudi v severni Italiji, Avstraliji, Novi Zelandiji, Kaliforniji in državah zahodne Evrope. V Sloveniji daje ta sorta čudovite sortne kakovosti. Najprimernejše lege so v vinorodni deželi Podravje (Šikovec, 1996).

Zaradi napada trsne uši smo morali žlahtno evropsko trto cepiti na odporne podlage ameriške trte. S cepljeno trto so se pri nas pojavile nove kakovostne sorte. Novi kloni dajejo sorazmerno velik pridelek. V dobrih letih daje ta pozna sorta odlična, fina vina z izredno sortno cvetico in žlahtno kislino (Rajher, 1994). Treba pa je poudariti, da prevelika rodnost, ki jo dajejo nekateri kloni Renskega rizlinga, lahko vpliva na slabšo kakovost tega vina (Šikovec, 1996).

2.2.3 Botanični opis grozda in jagode

Grozdi so valjaste oblike, majhen do srednje velik in zbit. Jagode so majhne do srednje velike, zelenkasto-rumene barve in pretkane z drobnimi žilicami. Sok jagod je sladek in aromatičen (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). Agrobiološka značilnost te pozno dozorevajoče sorte je v tem, da na koncu faze dozorevanja akumulira veliko sladkorja, pri tem pa ne izgubi veliko kislin.

2.2.4 Senzorični opis sorte

Renski rizling daje v severnih obdobjih vinogradniških conah najplemenitejša bela vina svetovnega slovesa. Iz sorte lahko dobimo vino s široko paleto po okusu in cvetici, od suhega, živahnega, mladega vina, do polnega vina s plemenito sladkobo kot posledico pozne trgatve (Šikovec, 1996).

Renski rizling je kot mlado vino rumenkasto slamnate barve z belimi in zelenimi odtenki. Z leti vino pridobi zlata pramena (Nemanič, 2006). Vina jagodnega ali suhega izbora so zlato rumene barve in s staranjem v steklenici dobijo značilno jantarno rumeno barvo (Šikovec, 1996).

Vonj vina je zelo odvisen od tal kjer raste, zato je njegov aromatičen značaj različen. Mlado vino diši po belem cvetju (lipa in akacija), divjih rožicah (košeničica, kozji parkeljci), ki jih najdemo na travniku, zaznan je tudi vonj belega sadja (vinogradniška breskev). Že leto do dve stara vina odlikujejo arome po suhem sadju in sladkih začimbah (Nemanič, 2006). Pri višjih kakovostnih stopnjah lahko vonj spominja na cimet, med in marelico (Šikovec, 1996). Pogoste so tudi mineralne vonjave. Renski rizling med belimi vini nima konkurenta, ki bi zmožel glede na tla kjer raste, tolikšno barvitost (Nemanič, 2006).

Na okus je vino elegantno, z živahnim telesom, če ima dovolj ekstraktnih snovi. Količina teh je najbolj odvisna od obremenitve trte. Značilna je poudarjena kislina, polnost in elegantna aroma, ki jo spremlja plemenita diskretna cvetica (Šikovec, 1996). Zaradi posebne prepoznavne kisline se je ponekod uveljavil tudi ostanek sladkorja, ki pomaga k ravnotežju okusa. Vendar prevelik ostanek sladkorja prej škodi kot pripomore k sadnim aromam dobrih renskih rizlingov. Vina se počasi in dolgo starajo ter pravo kakovost dosežejo šele po 2 do 4 letih. V dobrih letnikih je sorta primerna za izjemna predikatna vina (Nemanič, 2006).

2.3 VINSKE KVASOVKE

Mikroorganizmi se v naravi vedno nahajajo v združbi različnih vrst (Smole Možina, 2000). Na površini grozdne jagode se nahajajo različne vrste ne-*Saccharomyces* in *Saccharomyces* kvasovk, ki sodelujejo pri AF (Zabukovec in sod., 2015). Na nepoškodovanih grozdnih jagodah najdemo populacije kvasovk v rangju med 10^3 in 10^5 CFU/mL. Med njimi so prisotne tudi *Saccharomyces*, a v populaciji manjši od 50 CFU/mL (Fugelsang in Edwards, 2007).

Mikroflora, ki se nahaja na grozdju, je odvisna od temperature, količine padavin, zrelosti jagod in uporabe fungicidov. Mikrofloro, ki jo najdemo na vinski opremi, pa pogosto dominira *Saccharomyces cerevisiae* (Aranda in sod., 2011).

V moštu najdemo ne-*Saccharomyces* kvasovke, kot so *Hanseniaspora uvarum*, *Candida*, *Rhodotorula* in *Kluyveromyces*. Te so prisotne predvsem v začetnih stopnjah AF in imajo šibko sposobnost fermentacije sladkorjev v moštu. V poznejši fazi alkoholne fermentacije so aktivnejše kvasovke rodov *Pichia* in *Metschnikowia*, proti koncu pa prevladujejo sevi kvasovk *Saccharomyces*, ki so odpornejši na večjo vsebnost etanola (Zabukovec in sod., 2015).

Glavne vrste kvasovk, prisotnih pri fermentaciji mošta, še posebej *Saccharomyces cerevisiae*, obsegajo veliko število različnih sevov. Ti vplivajo na naravo in količino sekundarnih produktov, nastalih med AF ter na njeno hitrost (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

V grozdnem moštu se število ne-*Saccharomyces* kvasovk najprej povečuje. Prevladujejo kvasovke rodu *Hanseniaspora* in *Candida*, ki sodelujejo v predfermentacijskih procesih in na začetku AF. Prve ure po polnjenju fermentacijskih tankov z grozdnim sokom prevladujejo kvasovke, prisotne v grozdju. Rod *Hanseniaspora/Kloeckera* običajno obsega kar polovico celotne mikroflore (Aranda in sod., 2011).

Rast ne-*Saccharomyces* kvasovk je omejena na prve tri dni AF, potem pa te odmrejo zaradi previsoke občutljivosti na prisotnost etanola. Kljub kratkemu času sodelovanja pri fermentaciji lahko proizvajajo veliko produktov, ki na koncu vplivajo na kakovost vina (Manzanares in sod., 2011). Zaradi slabe tolerance do etanola večino teh kvasovk odmre, ko se stopnja etanola dvigne nad 6 %. Njihova rast je omejena tudi z dostopnostjo kisika (Fugelsang in Edwards, 2007). Spremembe v velikosti populacij, prisotnih v moštu, so povezane z naraščajočo prisotnostjo etanola, anaerobnimi pogoji in uporabo sulfidov med trgatvijo in pripravo mošta (Aranda in sod., 2011). Z odmiranjem populacij ne-*Saccharomyces* kvasovk v ospredje pridejo kvasovke rodu *Saccharomyces*. Ker niso tako občutljive na količino etanola, te še naprej fermentirajo preostali sladkor v moštu, predvsem glukozo, v etanol (Fugelsang in Edwards, 2007).

Kvasovke *Saccharomyces* se začnejo množiti po prvem dnevu fermentacije in dosežejo dominantnost nad ostalimi v 4. dnevu ter postanejo odgovorne za nadaljevanje in končanje AF (Aranda in sod., 2011). Pridelava kakovostnih vin je brez kvasovk rodu *Saccharomyces* nemogoča. Preostale kvasovke, prisotne v moštu, pa lahko na kakovost vina vplivajo pozitivno ali negativno (Fugelsang in Edwards, 2007).

Kvasovke ne-*Saccharomyces* in *Saccharomyces* proizvajajo različne encime. Ker mošt vsebuje številne komponente, kot so pektin, celuloza, proteini, lignin, so lahko ne-*Saccharomyces* kvasovke nepogrešljiv vir encimov, ki degradirajo te spojine in prispevajo k boljši barvi in bistrosti vin (Manzanares in sod., 2011).

Zanimanje za starterske kulture, ki poleg *Saccharomyces* vsebujejo tudi ne-*Saccharomyces* kvasovke, se povečuje, saj slednje prispevajo predvsem k nekaterim zaželenim organoleptičnim karakteristikam in se dobro dopolnjujejo s fermentativnimi lastnostmi *Saccharomyces* (Aranda in sod., 2011).

Kadar moštu ne dodamo starterske kulture, poteče spontana AF. Ta se pogosto uporablja v manjših kletah, kjer želijo ohraniti prepoznavne značilnosti svojih vin. Naravno prisotne kvasovke iz grozdja in kletarske opreme imajo večjo hidrolitično aktivnost, ki je pomembna za tvorbo aromatičnih spojin v vinu (Zabukovec in sod., 2015).

Ker so med procesom fermentacije v začetni fazi prisotne številne kvasovke, lahko v kasnejši fazi pride do upada živosti *Saccharomyces* kvasovk predvsem zaradi pomanjkanja kvasovkam dostopnega dušika in vitaminov. Zaradi nepredvidljivosti vin, pridobljenih s spontano AF, lahko vino vsebuje večje vsebnosti acetaldehida, očetne in piruvične kisline ter etilacetata, ki lahko posledično pomenijo večjo obremenitev vin z SO₂. Včasih pride celo do zaustavitve AF (Zabukovec in sod., 2015).

Na razmnoževanje kvasovk vplivajo tudi drugi parametri. Vrednosti pH mošta se nahajajo med 2,75 in 3,8, kar ne ovira rasti kvasovk. Težava lahko nastane pri pH nižjem od 2,8, saj v kombinaciji z naraščajočo prisotnostjo etanola lahko inhibira rast kvasovk (Aranda in sod., 2011).

Optimalna temperatura za rast kvasovk *Saccharomyces* je 30 °C, vendar je sposobna fermentirati mošt med 10 °C in 32 °C. Kljub visoki optimalni temperaturi za rast pa to ne pomeni nujno tudi najbolj optimalne temperature fermentacije, saj pri visoki temperaturi toksičnost alkohola naraste, izgubljajo pa se tudi hlapne snovi, ki prispevajo k organoleptični kakovosti vin. Po drugi strani prenizke temperature lahko povzročijo zaustavitev fermentacije. Nižja temperatura favorizira rast ne-*Saccharomyces* kvasovk v zgodnji stopnji fermentacije (Aranda in sod., 2011). Nizka temperatura fermentacije, med 10 °C in 15 °C, lahko poveča toleranco *Hanseniaspore* do etanola. Vina, fermentirana z ne-*Saccharomyces* kvasovkami, ki niso bila inokulirana s kvasovkami *Saccharomyces*, bi zato lahko ob nižjih temperaturah dala kakovostna vina z bolj intenzivno aromo kot tista, pri katerih smo inokulirali *Saccharomyces* (Fugelsang in Edwards, 2007).

V mošt običajno dodajamo inokulum selekcioniranih kvasovk, najpogosteje seve *S. cerevisiae*, ki so jamstvo za hitro in učinkovito AF. Te kvasovke imajo veliko prednosti, saj rastejo pri nizki temperaturi, so odporne na SO₂ in etanol, tvorijo malo H₂S, hlapnih kislin in acetaldehida ter imajo hiter začetek AF (Zabukovec in sod., 2015). Inokulacija kvasovk v mošt skrajša lag fazo fermentacije (Aranda in sod., 2011).

Starterske kulture običajno dodajamo moštu kot inokulum, ki ga pripravimo iz selekcioniranih liofiliziranih ali tekočih kvasovk. Redkeje jih vzgojimo sami iz mikroflore, ki se nahaja v našem vinogradu (Bavčar, 2006). Če želimo iz mikroflore, ki se nahaja v vinogradu izolirati kvasovke in proučevati značilne lastnosti posamezne mikrobne vrste, jo moramo najprej osamiti v čisti kulturi. Čista kultura vsebuje eno samo mikrobno vrsto, teoretično predstavlja celice, ki so zrastle iz ene same celice. Iz izhodnega vzorca prenesemo eno cepilno zanko na agarško ploščo in nacepimo na gojišče, tako da zrastejo posamezne kolonije. Te uporabimo za izolacijo čiste kulture (Smole Možina, 2000).

2.4 KEMIJSKA SESTAVA MOŠTA IN VINA

Kemijska sestava vina je lahko zelo različna, saj je odvisna od številnih naravnih danosti, pa tudi od ravnanja vinogradnika in vinarja.

Grozdni sok vsebuje 70 – 80 % vode, 10 – 25 % sladkorja, približno 1 % prostih organskih kislin (vinska, jabolčna, citronska in jantarna), 1 % soli (bitartrati) in 0,5 % mineralnih, dušikovih in pektinskih snovi. Od sladkorjev prevladujeta heksozi glukoza in fruktoza, manj je prisotnih pentoz (pod 2,5 g/kg) kot so arabinoza, ksiloza in ramnoza, ki v vinu ne fermentirajo (Nemanič, 2011).

Vode je v vinu med 75 in 85 %. Delež je odvisen od kakovosti vina, in sicer manjši je delež vode, večja je kakovost vina, saj so v vodi topne številne druge sestavine, ki so v primeru manjšega deleža vode toliko bolj zastopane (Šikovec, 1996). V vinu so odkrili že preko 1000 različnih snovi, znanstveniki pa še naprej odkrivajo nove (Bavčar, 2006). Vino ima v primerjavi z grozdnim sokom manjšo vsebnost sladkorja na račun nastajanja alkohola. Med fermentacijo nastajajo nove organske kisline, zmanjšuje se količina dušikovih spojin in vitaminov (Moreno in Peinado, 2012). Predvsem se reducira nitrat, zato visoka vsebnost nitratov v vinu lahko dokazuje "podaljšanje" vina z vodo (Šikovec, 1996).

2.4.1 Alkoholi

Etanol je najpomembnejši alkohol v vinu in nastaja med alkoholno fermentacijo ogljikovih hidratov mošta, predvsem s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* (Bavčar, 2006). V vinu se nahaja v deležu 9,5 - 12,5 vol.%, redkeje (pri nas v najboljših letnikih) lahko doseže tudi 15 vol.%, po zakonu pa mora imeti vino najmanj 8,5 vol.% alkohola (Šikovec, 1996). Vinu daje stabilnost, saj omeji razmnoževanje kvasovk in drugih mikroorganizmov, zagotavlja pa tudi posebne senzorične lastnosti, saj z vplivom na metabolizem kvasovk posledično vpliva tudi na vrsto ter količino nastalih spojin v vinu (Bavčar, 2006). Po vsebnosti alkohola delimo vina na lahka - do 10 vol.% alkohola, srednje težka - do 12,5 vol.% alkohola in težka - nad 12,5 vol.% alkohola (Šikovec, 1996).

Metanol v vinu ne nastane pri AF, ampak je posledica hidrolize pektinskih snovi pod vplivom encima pektinmetilesteraze. V človeškem telesu se metanol oksidira v formaldehid in mravljično kislino, ki sta toksična za centralni živčni sistem. Med normalnim potekom vinifikacije metanol nikoli ne doseže škodljive koncentracije, največja dovoljena koncentracija pa je omejena tudi z zakonom (Bavčar, 2006).

Glicerol nastaja kot stranski produkt fermentacije, v manjših količinah se lahko nahaja tudi v samem grozdju. Višje temperature fermentacije, prisotnost določenih sevov kvasovk v avtohtoni mikroflori in razpoložljive koncentracije sladkorjev, dušikovih spojin ter aminokislin vplivajo na njegovo končno količino v vinu. Glicerol deluje rahlo sladkasto in lahko pripomore k polnosti predvsem suhih belih vin (Bavčar, 2006).

Med višje alkohole štejemo vse tiste, ki imajo več kot dva ogljikova atoma. Če ne upoštevamo etanola, v vinu prispevajo približno polovico vseh aromatičnih snovi. Nekaj višjih alkoholov pride v vino z grozdem, a se ti večinoma odstranijo iz posode med AF in zato ne vplivajo na končni vonj vina. Ostali nastanejo iz ustreznih aminokislin in sladkorjev, vzporedno s sintezo etanola med AF. V vinu so prisotni v različnih koncentracijah in razmerjih, v splošnem je največ izoamil alkohola, sledijo mu amil alkohol, izobutil alkohol in n-propanol. Na veliko končno koncentracijo višjih alkoholov v vinu vpliva predvsem vrsta kvasovk, visoke temperature AF, prisotnost kisika in višji pH vina. Višji alkoholi v koncentraciji do 350 mg/L še pripomorejo k boljši senzorični kakovosti vina, pri večjih koncentracijah pa postanejo moteči (Bavčar, 2006).

2.4.2 Organske kisline

Organske kisline veliko prispevajo k fizikalno-kemijski in mikrobiološki stabilnosti ter senzorični kakovosti, predvsem belih vinih (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b). Prisotnost glavnih organskih kislin v vinu se odraža v vrednosti pH vina. Ta parameter določa baktericidno vrednost vina, ki je običajno med 2,9 in 3,3. Nizka vrednost pH se kaže kot higienska neoporečnost vin. Kadar pH preseže 3,6, je vino izpostavljeno negativnim biološko-kemijskim reakcijam, ki so lahko škodljive za človeški organizem (Šikovec, 1996).

Kisline imajo velik vpliv na sensoriko vina, prispevajo k boljši aromi, saj kislinska hidroliza sprošča proste terpene in fenole (Bavčar, 2006). Nekatere kisline so prisotne že v moštu, druge pa nastajajo med alkoholnim vrenjem. Razdelimo jih med nehlapne (vinska, jabolčna, citronska in jantarjeva) ter hlapljive (ocetna, maslena, mravljična...). Veliko hlapnih kislin kaže na vino slabše kakovosti (Simčič, 1987).

Nehlapne kisline so najbolj zastopane v vinu, njihova običajna masna koncentracija je med 5,5 in 8,5 g/L. Količina kislin je pogojena s klimo. V hladnejših podnebjih njihova koncentracija lahko preseže 8 g/L, medtem ko so v toplejših regijah koncentracije lahko le med 1 in 2 g/L (Moreno in Peinado, 2012). Med njimi prevladujejo vinska, jabolčna in citronska kislina (Bavčar, 2006). Vinska in jabolčna kislina skupaj predstavljata kar 90 % vseh kislin (Aranda in sod., 2011). Količinsko je v grozdju prisotne več vinske kisline kot jabolčne, poleg tega je vinska tudi močnejša, zato bolj vpliva na končno vrednost pH v grozdju. Vinska kislina ima dve hidroksilni skupini, medtem ko ima jabolčna le eno (Moreno in Peinado, 2012). S hlajenjem in povečanjem koncentracije alkohola se njena moč zmanjšuje. Optimalno daje prijeten okus svežine, prevelike količine pa dajejo okus nezrelosti.

Jantarjeva kislina nastane v manjši količini med alkoholnim vrenjem ter prispeva k formiranju buketa. Med staranjem vina se esterificira, nastali etilni sukcinat pa daje zelo prijeten vonj (Simčič, 1987). Citronska kislina je v vinu vedno prisotna, več jo je v belih vinih, njena prisotnost pa ne sme prekoračiti 0,5 g/L, saj v večjih količinah daje vinu oster okus. (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b) Jabolčna kislina je zaznavna predvsem v mladih vinih in jim daje karakteristično surovost. Pozneje se z biološkim razkisom delno spremeni v milejšo mlečno kislino. Mlečna kislina je proizvod biološkega razkisa vin. Pri mladih vinih jo je malo, s staranjem pa se povečuje in daje vinu mehko in bogat vonj (Simčič, 1987).

V grozdju je pogosto prisotnih še veliko število drugih kislin, ki pa so šibkejše in v mnogo manjših količinah (Moreno in Peinado, 2012).

Hlapne kisline so tiste, ki jih lahko predestiliramo s parno destilacijo (Bavčar, 2006). Imajo manj vpliva na koncentracijo skupnih kislin, več pa prispevajo k aromi vina (Nemanič, 2011). Manjše količine (do 0,3 g očetne kisline/L) hlapnih kislin, kot so mravljična, očetna in butanojska kislina, nastanejo kot stranski produkt med čisto AF vina s kvasovkami. Običajno vsebujejo mlada vina manj hlapnih kislin kot stara, prav tako so tvorbe le teh bistveno manjše v vinih pridelanih iz moštov z manjšo koncentracijo sladkorja. Pri biološkem razkisu tvorijo mlečnokislinske bakterije manjše količine očetne kisline, predvsem z razgradnjo citronske. Napako in bolezen vina (očetno kislinski ton ali cik) lahko zaznamo senzorično že med 0,6 - 0,9 g/L, kar je manj kot je zakonsko dovoljena maksimalna koncentracija (Košmerl in Kač, 2007). V manjših koncentracijah mravljično kislino tvorijo plesni, maslena kislina, ki je produkt maslenokislinskih bakterij in se v večji koncentraciji pojavi pri pokvarjenih vinih (Šikovec, 1996). Vrednost očetne kisline nad 0,8 g/L, je posledica mikrobiološkega kvara, predvsem očetnokislinskih bakterij (Bavčar, 2006).

2.4.3 Mineralne snovi

Mineralne snovi, raztopljene v vodi, pridejo v gozdno jagodo prek koreninskega sistema. Količina elementov je odvisna od več dejavnikov in se običajno giblje med 1,8 in 4 g/L. Najpomembnejše mineralne snovi so kalij, natrij, kalcij, magnezij, železo, fosfat (P_2O_5), sulfat, klorid (NaCl) in nitrat. V sledih so prisotni tudi elementi, kot so aluminij, arzen, barij, svinec, jod, baker, mangan in cink. Med alkoholnim vrenjem in pri stabilizaciji vina se nekaj mineralnih snovi izloči zaradi vezave na kisline in prehoda iz topne v netopno obliko, zato je njihova količina v vinu manjša kot v moštu (Šikovec, 1996). Mineralne snovi vplivajo na barvo, čistost, vonj in okus vina, ker se spojijo s kislinami in dajejo manj trpek okus. Pomembne so tudi pri alkoholnem vrenju, saj koristijo kvasovkam (Simčič, 1987).

2.4.4 Dušikove spojine

Vsebnost dušikovitih snovi v moštu je odvisna od sestave tal, klimatskih dejavnikov, lege vinograda, gnojenja in asimilacije preko koreninskega sistema, sorte, stopnje zrelosti grozdja in mikrobiološke okužbe grozdnih jagod (Bavčar, 2006). V samem grozdju najdemo različne organske dušične spojine v obliki aminokislin, peptidov in beljakovin. Aminokislinski dušik predstavlja v moštu 60 – 90 % dušika (Nemanič, 2011). Med anorganske dušikove snovi štejemo amonijak in nitrat. Za razmnoževanje in rast kvasnih celic in s tem normalni potek AF so izrednega pomena anorganski amonijev ion in aminokislina (Šikovec, 1996).

2.4.5 Fenoli

Fenoli so ciklične benzenove spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami (Bavčar, 2006). Enostavne fenolne spojine lahko izvirajo iz samega grozdja, v mošt in vino preidejo iz grozdnih jagod, zato na njihovo koncentracijo vpliva sorta vinske trte, čas kontakta grozdnega soka s kožicami in pečkami, koncentracija etanola in temperatura fermentacije. Kompleksnejše fenolne spojine (kot so na primer tanini) se ekstrahirajo v vino iz lesene vinske posode. Prispevajo tako k barvi kot stabilnosti vina, v večjih količinah pa so odgovorne za grenak okus vina in trpkost. V prisotnosti kisika se hitro oksidirajo in povzročajo porjavitev vina.

Vrednosti med 150 in 400 mg skupnih fenolnih spojin ustreza belim vinom, povprečna koncentracija je 225 mg/L (Košmerl in Kač, 2007). Polifenoli v vinu vplivajo na vrsto sezoričnih lastnosti, kot so barva, okus in aroma. Antociani dajejo vinu rdečo, flavonoidi rumeno in tanini rjavo barvo. Delujejo tudi kot baktericid in fungicid (Moreno in Peinado, 2012). Poleg antimikrobne aktivnosti delujejo tudi kot antioksidanti in konzervansi (Bavčar, 2006).

2.4.6 Estri in acetaldehid

Estri imajo velik vpliv na aromo vina. Najdemo jih preko 160, vendar so za zaznavo prisotni v premajhnih koncentracijah. Nastanejo z reakcijami med karboksilno skupino organskih kislin in hidroksilno skupino alkoholov ali fenolov. Estre, ki nastanejo iz alkoholov, imenujemo tudi alifatski estri, v vinu so prisotni v večjih koncentracijah kot fenolni estri. Pomembnejši med njimi so etil heksanoat, etil oktanoat in etil dekanat. Nastanejo z reakcijo etanola in nasičenih maščobnih kislin. Prav tako pomembni so tisti, ki nastanejo pri reakciji med etanolom ali višjimi alkoholi in očetno kislino. Med njih spadajo etilacetat, izoamil acetat, izobutil acetat, 2-feniletacetat. Povezujemo jih s sadno in cvetlično aromo mladih belih vin (Bavčar, 2006). Acetaldehid predstavlja več kot 90 % vseh aldehydov v vinu. Ti nastajajo tekom AF in se po končani AF reducirajo v etanol, zato se njihova vsebnost zmanjša. Je pomembna komponenta vonja vina, ki pa v večjih koncentracijah ni zaželena. Acetaldehid lahko nastaja tudi pri oksidaciji fenolnih snovi in etanola. Porablja se pri stabilizaciji barve, predvsem rdečih vin. Hitro se veže na dodani SO₂ (Bavčar, 2006).

2.4.7 Sladkorji

V grozdju, moštu in vinu najdemo monosaharide, disaharide in polisaharide. Monosaharide razdelimo na heksoze in pentoze. Najpomembnejši in količinsko najštevilčnejši sta heksozi glukoza in fruktoza, ki sta glavni substrat za kvasovke pri AF (Bavčar, 2006). Skupna koncentracija sladkorjev v moštu je običajno med 170 in 220 g/L. Če koncentracija preseže 300 g/L, lahko to že ovira fermentacijo, saj zaradi osmotskega tlaka inhibira rast kvasovk (Aranda in sod., 2011). Pentoz kvasovke ne morejo uporabiti kot substrat, v moštu in vinu se nahajajo v majhnih koncentracijah. Le v izredno suhih vinih, kjer je koncentracija vseh sladkorjev manjša od 1,5 g/L, predstavljajo večinski delež. Med disaharidi v moštu najdemo saharozo, tudi te kvasovke ne morejo presnavljati, lahko pa presnavljajo produkte njene hidrolize glukoze in fruktoze. Med polisaharidi so v moštu in vinu prisotni pektini, škrob in glukani (Bavčar, 2006). Koncentracija le-teh se med alkoholno fermentacijo zmanjša do 50 % zaradi vedno večje prisotnosti etanola (Jacobson, 2006).

2.4.8 Vitamini

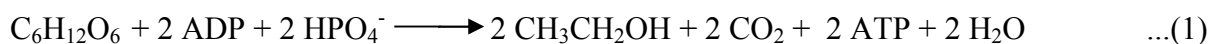
Grozdje vsebuje majhno količino vitaminov, v jagodni kožici najdemo B₁, B₂, B₃, B₆ in mezoinozitol (Nemanič, 2011). Nekaj je tudi vitamina C. Vsebnost vitaminov se med AF znatno zmanjša (Bavčar, 2006), saj so pomembni rastni faktorji za kvasovke (Moreno in Peinado, 2012).

2.5 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Sprememba mošta v vino je mikrobiološki proces, imenovan alkoholna fermentacija (AF) (Bavčar, 2006). Proces vodijo kvasovke različnih vrst, ki se nahajajo na grozdni jagodi in jih v grobem razdelimo v skupini *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* kvasovk (Zabukovec in sod., 2015). Gre za katabolični proces, pri katerem se porablja sladkor kot vir energije in kot produkt nastaja etanol in CO₂ (Moreno in Peinado, 2012).

Glukoza in fruktoza v moštu omogočata celicam kvasovk v anaerobnih pogojih vzdrževati nivo energije z alkoholno fermentacijo (Aranda in sod., 2011). Glukoza in fruktoza se najprej v kemičnem procesu glikolize razgradita do piruvata. AF se začne s koncem glikolize, kjer se v anaerobnih pogojih piruvat najprej razgradi na acetaldehid in CO₂ ter naprej v etanol (Jacobson, 2006).

Metabolična pot poteče v citoplazmi in je predstavljena z naslednjo, poenostavljeno formulo:



(Aranda in sod., 2011)

Iz ene molekule sladkorja med alkoholno fermentacijo nastaneta 2 molekuli etanola, CO₂ in 33 kcal energije. AF je eksotermna reakcija, pri kateri se sprošča veliko energije v obliki toplote (Nemanič, 2011). Toplota, generirana iz presežka energije, ki ni bila uporabljena za celični metabolizem, lahko povzroča težave pri AF, saj zvišanje temperature mošta lahko uniči nekatere kvasovke. Med AF je zato potrebna kontrola temperature in odvajanje toplote (Jacobson, 2006).

AF so pri temperaturi pod 15 °C sposobni v dveh tednih zaključiti le redki sevi kvasovk. Velika večina kvasovk se ne razmnožuje pod 15 °C niti nad 35 °C. Najboljše rezultate dajejo, kadar fermentacija poteče pri temperaturah med 15 in 20 °C.

Kvasovke se v svojem temperaturnem razponu hitreje razmnožujejo pri višji temperaturi, toda visoka temperatura AF ni priporočljiva, saj tvorijo kvasovke v tem primeru preveč neželenih snovi, predvsem prevelike količine hlapnih kislin in višjih alkoholov (Nemanič, 2011). Fermentacijska temperatura vpliva tudi na samo sestavo vina, in sicer pri visoki temperaturi fermentacije nastane več višjih alkoholov in glicerola, negativno pa vpliva na količino aromatičnih snovi, predvsem v belih vinih. Temperatura nad 37 °C upočasni ali celo ustavi fermentacijo (Moreno in Peinado, 2012).

Nižje temperature fermentacije favorizirajo rast ne-*Saccharomyces* kvasovk v zgodnjem stadiju fermentacije (Aranda in sod., 2011). Avtohtona kultura kvasovk ima gotovo vpliv na uveljavljeni značaj vina iz prepoznavnih leg (Nemanič, 2011).

Ko kvasovke fermentirajo mošt, se njegova kemijska sestava spremeni. V mladem vinu tako praktično ni več sladkorjev, saj se le-ta pretvori v etanol. Ob prisotnosti alkohola se iz kožic grozdja ekstrahirajo fenolne spojine, zato je teh v vinu več kot v moštu. Ker kvasovke kot sladkor raje porabljajo glukozo kot fruktozo, je razmerje teh dveh sladkorjev v vinu drugačno kot v moštu (Moreno in Peinado, 2012).

V procesu se sintetizira še veliko število drugih kemičnih spojin kot so CO₂, glicerol, nekatere kisline (ocetna, jantarna, mlečna), višji alkoholi, aldehidi, ketoni, estri. Vsi ti predstavljajo sekundarne in terciarne arome vina (Nemanič, 2011).

AF lahko poteče z naravno prisotno mikrofloro iz grozdja in kletarske opreme, vendar zaradi dobrih fermentacijskih lastnosti pogosto inokuliramo mošt s selekcioniranimi kvasovkami vrste *S. cerevisiae* (Bavčar, 2006). Potek AF lahko spremljamo na več različnih načinov, kot so merjenje gostote, volumna nastalega CO₂, količine sproščene toplote in spremembe mase mošta (Jacobson, 2006).

2.6 AROMA VINA

Aromo v vinu delimo na primarno, sekundarno in terciarno. K primarni aromi in okusu največ doprinesejo terpeni (Manzanares in sod., 2011), ki večinoma izvirajo iz grozdja. So nosilci sortne arome pri belih sortah, predvsem v muškatih in rizlingih (Bavčar, 2006). Sekundarno aromo imenujemo tudi fermentacijska aroma, ker nastane med procesom AF zaradi metabolizma kvasovk. Nastajajo etanol, CO₂ in glicerol. Kljub velikim količinam teh spojin na aromo mnogo bolj vplivajo stranski produkti AF, kot so višji alkoholi, hlapne kisline, estri in v manjši meri tudi aldehidi (Manzanares in sod., 2011). V vinu najdemo preko 160 različnih estrov, vendar velikokrat v premajhnih koncentracijah za zaznavo. Delimo jih na alifatske in fenolne, s primerno tehnologijo in vodenjem AF lahko vplivamo na tvorbo večjih koncentracij sadnih estrov. Estri, nastali iz fenolov, dajejo vonj po začimbah lahko pa tudi hlevu in konjih (Bavčar, 2006). Terciarne arome nastajajo z zorenjem vina (Manzanares in sod., 2011).

2.7 KAKOVOSTNI PARAMETRI VINA

Kakovost vina odlikuje vrsta naravnih dejavnikov in tehnološke rešitve pri predelavi grozdja, pri čemer veliko vlogo igra človekovo znanje. V nobeni drugi pijači niso tako močno izražene značilnosti tal in podnebja, da se te lastnosti odrazijo v vinu kot skladna celota, pa je odvisno od znanja vinogradnika in vinarja.

Poglavitni dejavniki, ki vplivajo na kakovost vina, so poreklo, kakovost letnika, čas in način trgatve ter predelava grozdja. Poreklo vina označuje območje, kjer pridelujemo grozdje. Odraža se v kemijski sestavi mošta in je odvisna od tal in podnebnih razmer. Veliko vlogo pri severnih legah ima nagib in višina lege. Najboljše so JZ lege, ker so zvečer dlje časa obsijane s soncem in je manjša možnost, da pride do pozebe. Vrsta tal vpliva na polnost in kompleksnost vina. (Šikovec, 1996).

Vinorodna dežela Podravje spada med severna vinogradniška območja, kjer je povprečna temperatura pridelave grozdja okoli 9 °C. Kakovost letnika je odvisna od letnih podnebnih razmer. Pomembna je količina in razporeditev padavin v posameznih mesecih, saj se z vodo iz tal prenašajo rudninske snovi. Suša lahko zaustavi akumuliranje sladkorja. (Šikovec, 1996).

Kakovost vina je mnogo več kot samo razmerje med sladkorjem in titrabilnimi kislinami v grozdju, ki ga podamo z zrelostnim faktorjem. Potrebne so številne snovi, ki dajejo vinu telo, in hlapne snovi, ki dajejo cvetico (Šikovec, 1996).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Mošt

Za poskus smo uporabili mošt renskega rizlinga iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija. Grozdje je bilo obrano 3. oktobra 2012 v podokolišu Srednje Slovenske gorice.

3.1.2 Izolat avtohtonih kvasovk

Vrsta kvasovk je bila izolirana iz vzorca mošta, pridelanega v podokolišu Srednje Slovenske gorice. Test API 20C AUX je pokazal, da gre za sev kvasovk *S. cerevisiae*. Ustrezno namnoženo in pripravljeno kot inokulum, smo dobljeni kvasni izolat uporabili za fermentacijo v tankih 1, 2, 3 in 4.

3.1.3 Pribor in oprema

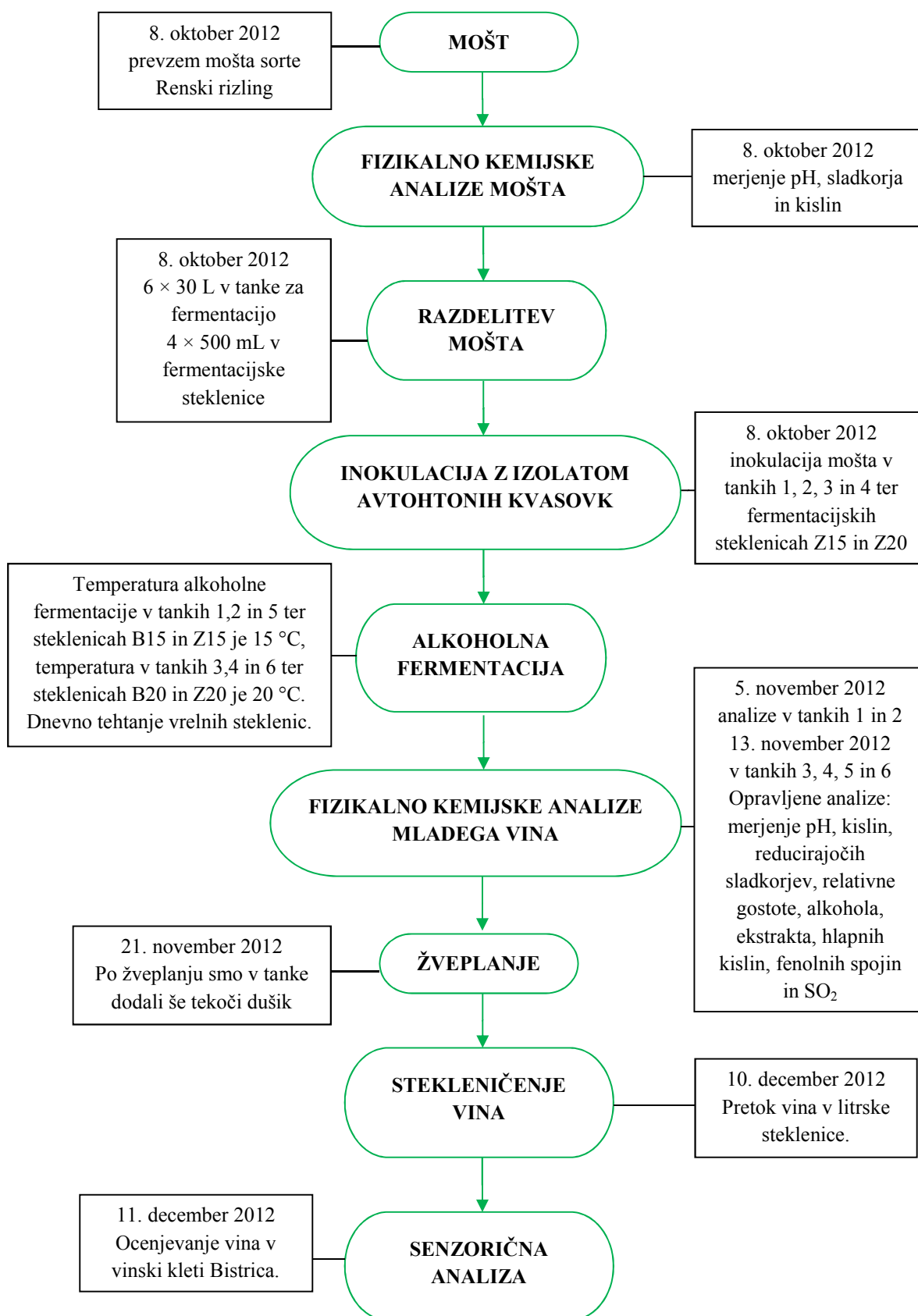
Pri analizah mošta in vina smo uporabljali standardni laboratorijski pribor ter naslednjo opremo:

- digitalni refraktometer (REF 520, Silverado Trading Company, Kitajska)
- pH-meter s kombinirano stekleno elektrodo (Mettler Toledo DL50 Graphix)
- denzimeter (Mettler Toledo DE45 Density Meter)
- destilacijska naprava (D.E.E. Gibertini)
- generator pare (VADE, Gibertini)
- spektrofotometer (UV-VIS)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Potek poskusa

Slika 1 prikazuje nastavitev, potek in časovni okvir poskusa.



Slika 1: Shematski potek poskusa

3.2.2 Nastavitev fermentacijskega poskusa

3.2.2.1 Nastavitev fermentacijskega poskusa v tankih

Za poskus smo uporabili 180 litrov razsluzenega mošta sorte Renski rizling iz vinorodnega podkoliša Srednje Slovenske gorice. Razdelili smo ga na 6 enakih delov in vsakega pretočili v enega od šestih 35-litrskih tankov, ki smo jih pred tem ustrezno očistili in označili s števili od 1 do 6. Tanke smo zaprli z vrelnimi vehami.

V tanke 1, 2, 3 in 4 smo moštu pri 13 °C dodali izolat avtohtonih vinskih kvasovk *S. cerevisiae*. V tankih 5 in 6 pa smo pustili mikrofloro, ki je bila prisotna v moštu samem.

Nastavili smo še temperaturo fermentacije, in sicer v tankih 1, 2 in 5 na 20 °C in v tankih 3, 4 in 6 na 15 °C.

3.2.2.2 Nastavitev poskusa v fermentacijskih steklenicah

V vsako od 4 vrelnih steklenic smo natočili 500 mL razsluzenega mošta sorte Renski rizling. V dve vrelni steklenici smo dodali izolat avtohtonih kvasovk in ju označili s črko Z. V drugih dveh vrelnih steklenicah smo pustili avtohtono mikrofloro in ju označili z B. Vrelne steklenice smo zaprli z vrelno veho. Eno steklenico z oznako Z in eno z oznako B smo postavili v prostor s temperaturo 15 °C in ju označili s številko 15, drugi dve steklenici z oznakama B in Z smo postavili v prostor s temperaturo 20 °C in ju označili s številko 20.

3.2.3 Fizikalno-kemijske analize mošta

3.2.3.1 Vsebnost sladkorjev

Merjenje vsebnosti skupnega sladkorja je najpogosteje opravljena analiza grozdnega soka, saj gre za pomemben kazalec kakovosti grozdja. Najmanjša dovoljena vsebnost sladkorjev ob trgatvi je 65 °Oe (Jug in sod., 2014).

Vsebnost sladkorja v moštu smo izmerili z digitalnim refraktometrom. Na prizmo smo s kapalko prenesli nekaj kapljic vzorca mošta in direktno odčitali vsebnost sladkorja v °Oe.

3.2.3.2 pH mošta

Za merjenje pH v vzorcu mošta smo uporabili pH-meter s kombinirano stekleno elektrodo. Pred merjenjem smo pH-meter umerili z dvotočkovno kalibracijo pri 20 °C s pufrnima raztopinama pH 4,00 in pH 7,02. Umerjenost smo preverili z vrednostjo pH standardne raztopine, ki ima pri 20 °C pH 3,57 (Košmerl in Kač, 2007).

Vzorec mošta smo prefiltrirali in ga 50 mL prenesli v 100 mL čašo ter vanj potopili elektrodo pH-metra. Vrednost pH nam predstavlja razliko v potencialu med dvema elektrodama potopljenima v mošt. Ena elektroda je referenčna in ima stalen potencial, druga steklena elektroda je merilna in ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v merjenem vzorcu (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.3.3 Skupne in titrabilne kisline v moštu

Za merjenje skupnih in titrabilnih kislin v moštu smo uporabili pH-meter s kombinirano stekleno elektrodo. Ker smo pred to meritvijo izvedli meritev pH, ponovna kalibracija pH elektrode ni bila potrebna.

Vzorec mošta smo najprej prefiltrirali in ga 25 mL prenesli v 100 mL čašo. Elektrodo smo potopili v vzorec in odčitali začetno vrednost pH. Izbrali smo metodo dvotočkovne titracije s prvo končno točko titracije pri pH 7,00 in drugo na 8,20. Titracija je potekla z 0,1 M raztopino NaOH do pH 7,00, kot rezultat smo odčitali porabo baze a_1 . Nadaljevali smo še s titracijo do končne točke titracije pri pH 8,20 in ponovno odčitali porabo baze a_2 , ki predstavlja porabo baze za titracijo od pH 7,0 do pH 8,20.

Masno koncentracijo titrabilnih kislin smo izračunali po formuli (2):

$$TK_1 \text{ (g/L)} = \frac{a_1 \cdot c \cdot M}{V \cdot n} \quad \dots(2)$$

Masno koncentracijo skupnih kislin pa po formuli (3):

$$TK_2 \text{ (g/L)} = \frac{a_3 \cdot c \cdot M}{V \cdot n} \quad \dots(3)$$

Pri tem a_3 predstavlja celokupno porabo baze, ki je vsota porabe baze a_1 in a_2 .

c = koncentracija baze NaOH

M = molska masa vinske kisline 150,09 g/mol

V = volumen vzorca

n = molsko razmerje kemijske reakcije med NaOH in vinsko kislino ($n = 2$).

Rezultata TK_1 in TK_2 nam predstavljata masno koncentracijo kislin, izraženih kot ekvivalent vinske kisline v g/L (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.4 Vrelne steklenice in fermentacijska krivulja

Hitrost fermentacije je pri suhih belih vinih odvisna od številnih parametrov, nanjo še posebej vplivajo: količina sladkorja v moštu, vrsta kvasovk in temperatura, pri kateri poteka AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Vse 4 vrelne steklenice smo tehtali vsak dan ob istem času in preverili ter zabeležili temperaturo prostora, v katerem so se nahajale steklenice. Tako smo dnevno spremljali izgube mase vrelnih steklenic na račun sproščenega CO₂ med alkoholno fermentacijo.

3.2.5 Fizikalno-kemijske analize vina

3.2.5.1 Določanje pH mladega vina

Za merjenje pH v vzorcih smo uporabili pH-meter s kombinirano stekleno elektrodo. Postopek merjenja je enak kot pri analizi mošta.

3.2.5.2 Določanje skupnih in titrabilnih kislin v mladem vinu

Za merjenje skupnih in titrabilnih kislin smo uporabili pH-meter s kombinirano stekleno elektrodo. Postopek analize je bil enak analizi mošta.

3.2.5.3 Določanje reducirajočih sladkorjev

Reducirajoče sladkorje v vzorcih mladega vina smo določili s titracijsko metodo po Rebeleinu.

V 250 mL erlenmajerico smo odpipetirali 2 mL vzorca mladega vina in mu dodali 10 mL S1 (raztopina bakrovega sulfata, CuSO₄) in 5 mL S2 (raztopina kalijevega-natrijevega tartrata, C₄H₄KNaO₆). Vsebino erlenmajerice smo premešali in postavili na električni grelec za točno minuto in pol, da je vsebina vrela. Erlenmajerico smo ohladili pod tekočo vodo in ohlajeni dodali po 10 mL raztopin S3 (raztopina kalijevega jodida KI), S4 (16 % raztopina žveplove (VI) kisline, H₂SO₄) in S5 (raztopina škrobovice). V erlenmajerico smo dodali magnet in jo postavili na magnetno mešalo ter vsebino titrirali s S6 (raztopina natrijevega tiosulfata, Na₂S₂O₃) do prehoda iz temno modre raztopine v slamnato rumeno barvo (Košmerl in Kač, 2007).

Reagenti, uporabljeni v tej metodi preden raztopino segrevamo ob vrenju, povzročijo oksidacijo reducirajočih sladkorjev v karboksilne kisline, dvovalentni bakrovi ioni iz reakcijske zmesi pa se reducirajo do bakrovega (I) oksida (Cu_2O), ki se iz raztopine izloči kot netopna oborina. Preostali Cu^{2+} se v raztopini kalijevega jodida v kislem reducirajo, nastali jod pa določimo titrimetrično z $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in škrobovico kot indikatorjem.

Ker so reagenti uporabljeni pri tem poskusu določenih koncentracij, je porabljen volumen titranta S6 številčno enak koncentraciji reducirajočih sladkorjev v vzorcih vina. Te smo zato lahko v g/L direktno odčitali iz birete (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.5.4 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola

Vzorci vina smo najprej filtrirali in termostairali pri 20 °C. Nato smo z vzorcem vina sprali resonančno U-cevko v denzimetru in s pomočjo injekcijske brizge ponovno napolnili cevko z vzorcem ter izmerili relativno gostoto vina.

Z vzorci vina smo napolnili 100 mL merilne bučke in jih termostairali pri 20 °C. S kapalko smo odvzeli toliko vina, da je bilo vzorca točno do spodnjega meniska oznake. Celotno vsebino bučke smo kvantitativno prenesli v destilacijsko posodo in nato še 3-krat sprali merilno bučko z deionizirano vodo. V destilacijsko posodo smo dodali še 5 mL 12 % raztopine kalcijevega oksida za boljšo električno prevodnost in 3 kapljice protipenilca.

Vzorec smo destilirali v 100 mL merilno bučko do približno 80 mL ter z deionirirano vodo dopolnili bučko pod oznako. Bučko z alkoholnim destilatом smo ponovno termostairali v vodni kopeli pri 20 °C. Merilno bučko smo z deionizirano vodo dopolnili točno do oznake in z denzimetrom izmerili relativno gostoto alkoholnega destilata. Resonančno U-cevko smo pred vsako meritvijo očistili z vzorcem alkoholnega destilata. Kot rezultat smo odčitali relativno gostoto alkoholnega destilata in koncentracijo alkohola v vol.% (Košmerl in Kač, 2007).

Relativno gostoto skupnega ekstrakta vina smo izračunali po Tabariéjevem obrazcu:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(4)$$

d_{SE} = relativna gostota skupnega ekstrakta

d_V = relativna gostota vzorca vina

d_A = relativna gostota alkoholnega destilata

Iz dobljenih d_{SE} smo iz preglednice v prilogi A odčitali masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta (SE) v g/L (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.5.5 Določanje sladkorja prostega ekstrakta

Sladkorja prosti ekstrakt je po definiciji razlika med skupnim suhim ekstraktom in reducirajočimi sladkorji, njegova minimalna vrednost je zakonsko predpisana. Razmerje med alkoholom in skupnim ekstraktom se uporablja za ugotavljanje potvorb vina pred stekleničenjem (Košmerl in Kač, 2007).

$$SPE = SE - RS \quad \dots(5)$$

SPE - sladkorja prosti ekstrakt

SE - skupni suhi ekstrakt

RS - reducirajoči sladkorji

3.2.5.6 Določanje hlapnih kislin

Hlapne kisline smo v vzorcih mladega vina določili tako, da smo po destilaciji vzorca z vodno paro destilat titrirali s standardizirano vodno raztopino natrijevega hidroksida.

S pipeto smo prenesli 20 mL vzorca v destilacijsko bučko in dodali 1 mL 50 % raztopine vinske kisline ter sprali stene destilacijske bučke z deionizirano vodo. V 250 mL erlenmajerico smo lovili 150 mL destilata. Destilatu v erlenmajerici smo dodali 3 kapljice fenolftaleina in takoj titrirali s standardizirano 0,100 M raztopino natrijevega hidroksida, dokler se brezbarvna raztopina ni obarvala svetlo rožnato. Dobljeno porabo titranta smo uporabili v formuli za določitev hlapnih kislin:

$$HK = a \cdot c \cdot M \cdot \frac{50}{1000} \quad \dots(6)$$

Pri čemer je:

HK= koncentracija hlapnih kislin, izražena kot masna koncentracija (g/L) očetne kisline

a= poraba titranta v mL

c = koncentracija NaOH

50 = redčitveni faktor

M = molska masa očetne kisline (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.5.7 Določanje fenolnih spojin v vinu

Fenolne spojine v vzorcih mladega vina smo določili s spektrofotometrično metodo po Singletonu in Rossiju.

Za umeritveno krivuljo smo vzeli 100 mL merilne bučke in jim s pipeto dodali osnovne raztopine galne kisline v količinah, ki so prikazane v prilogi B, ter jih dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Vsebino merilnih bučk smo premešali in iz vsake s pipeto vzeli po 1 mL standardne raztopine in jo prenesli v nove 100 mL merilne bučke. V vsako bučko smo dodali 60 mL deionizirane vode. V čaši smo pripravili Folin-Ciocalteujev reagent (F.C.) in ga razredčili z deionizirano vodo v razmerju 1:2. V vsako merilno bučko smo dodali 5 mL razredčenega F.C. reagenta. Vsebino bučk smo premešali in po 30 sekundah v vsako dodali 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata. Z deionizirano vodo smo dopolnili bučke do oznake, ponovno premešali in termostatirali 2 uri pri temperaturi 20 °C. Merilne bučke smo ponovno premešali in vsebino iz vsake prenesli v 10 mm kiveto ter izmerili absorbance proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm. Iz dobljenih meritev smo narisali umeritveno krivuljo odvisnosti absorbance od masne koncentracije galne kisline ter izračunali enačbo premice.

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih smo določili glede na umeritveno krivuljo. V merilne bučke smo odpipetirali 1 mL vzorca mladega vina ter mu dodali 60 mL deionizirane vode in 5 mL razredčenega F.C. reagenta. Vsebino bučk smo premešali in po 30. sekundah dodali še 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata, dopolnili smo z deionizirano vodo do oznake ter termostatirali 2 uri pri 20 °C. Pred meritvijo s spektrofotometrom smo vsebino še enkrat premešali, prelili vzorce v 10 mm kivete in izmerili absorbance pri valovni dolžini 765 nm. Končno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih izraženo v mL galne kisline/L smo izračunali po enačbi iz umeritvene krivulje.

3.2.5.8 Določanje žveplovega dioksida

Skupni SO₂ v vzorcih mladega vina smo določili z jodometrično titracijo po Ripperjevi metodi.

V erlenmajerico smo odpipetirali 25 mL vzorca mladega vina in mu dodali 25 mL 0,1 M raztopine NaOH ter vsebino premešali, pokrili in pustili stati točno 10 minut. V tem času je potekla hidroliza vezanega SO₂. Po 10 minutah smo dodali 5 mL škrobovice in 10 mL razredčene žveplove (VI) kisline ter titrirali s standardizirano raztopino joda s koncentracijo 0,0100 M do prehoda v modro barvo.

Koncentracijo skupnega SO₂ v vzorcih mladega vina smo izračunali po formuli 7:

$$\text{SO}_2 = \frac{a \cdot c \cdot M \cdot 1000}{n \cdot V} \quad \dots(7)$$

a = poraba titranta, volumen standardizirane raztopine joda

c = koncentracija I₂

M = molska masa SO₂ = 64,06 g/mol

N= molsko razmerje kemijske reakcije med I₂ in SO₂ = 1

V = volumen vzorca vina

Rezultat je masna koncentracija skupnega SO₂, izražena v mg/L (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.6 Senzorična analiza vina

Deskriptivna analiza - profiliranje po lastni presoji

Po definiciji je opisna analiza postopek opisovanja zaznanih senzoričnih lastnosti izdelka, v vrstnem redu, kot jih zaznavamo. Senzorične lastnosti izdelka identificiramo, jih opišemo z besedo in nato tudi kvantitativno ovrednotimo. Za opisno analizo potrebujemo izšolan panel, ki je v svojih ocenah dosleden in ponovljiv (Golob in sod., 2006).

Profiliranje po lastni presoji ne zahteva uglasenosti panela. Vsak preskuševalec mora sam izdelati listo njemu razumljivih deskriptorjev, katere mora pri ocenjevanju dosledno uporabljati. S tem je omogočeno preizkuševalcu ocenjevanje na svoj način. Pomanjkljivost metode je v možnosti, da vodja panela ne interpretira objektivno pomena uporabljenih izrazov, zato se zahteva večje število ponovitev (Golob in sod., 2006).

Po končanem alkoholnem vrenju smo vino stekleničili. Senzorično analizo smo opravili 11. decembra 2012 v vinski kleti Bistrica. Sodelovalo je 7 ocenjevalcev. Vzorce mladega vina smo ocenili tako, da smo opisali bistrost, barvo glede na intenzivnost in odtenek, zaznane vonje,okus ter harmoničnost.

3.2.7 Statistična analiza

V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s postopkom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Rezultati poskusa so bili analizirani po metodi najmanjših kvadratov s postopkom GLM (angl. General Linear Model).

Za analizo vpliva vrste kvasovke in temperature fermentacije na fizikalno-kemijske parametre renskegarizlingasmo uporabili statistični model, v katerega smo vključili fiksni vpliv dodatka kvasovk (K: $i = 2$, avtohtone kvasovke in brez kvasovk) in temperature fermentacije (T: $j = 2$, 15 °C in 20 °C): $y_{ijk} = \mu + K_i + T_j + e_{ijk}$. Interakcija vpliva dodatka kvasovk in temperature fermentacije je bila neznačilna, zato v model ni vključena. Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA

Pred začetkom fermentacije smo analizirali vzorec mošta, da bi ugotovili sladkorno stopnjo, koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin in vrednost pH.

Preglednica 1: Sladkorna stopnja, pH ter koncentracija titrabilnih (TK₁) in skupnih (TK₂) kislin v moštu

Sladkorna stopnja (°Oe)	92
pH	3,16 ± 0,001
TK₁ (g/L)	5,71 ± 0,025
TK₂ (g/L)	5,96 ± 0,015

V vinorodni deželi Podravje je normalna povprečna količina naravnega sladkorja za sorto Renski rizling 80 °Oe (Nemanič in sod., 2001). Naš vzorec ima v primerjavi s tem mnogo večjo sladkorno stopnjo. Iz sladkorne stopnje lahko določimo okvirno koncentracijo alkohola v vinu, ob predpostavki, da bi ves sladkor med alkoholno fermentacijo povrel v alkohol (Košmerl in Kač, 2007). Glede na sladkorno stopnjo v našem vzorcu lahko ob popolnem povretju sladkorja pričakujemo alkoholno bogata vina.

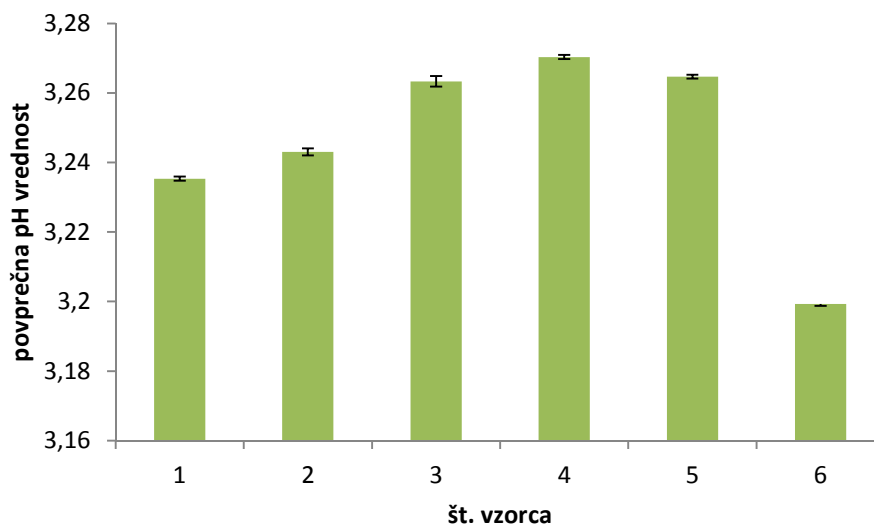
Vrednost pH v moštih je navadno med 3,1 in 3,6 (Košmerl in Kač, 2007). Naš vzorec je na spodnji meji tega območja, saj je njegova vrednost pH 3,16. pH je parameter, ki določa baktericidno vrednost vina. Nizka pH vrednost kaže na higienično neoporečnost (Šikovec, 1996).

Skupna vsebnost karboksilnih kislin, izražena kot masa vinske kisline na liter, je v moštu med 6 in 9 g/L. Prevladujoče kisline v moštu so vinska, citronska in jabolčna (Košmerl in Kač, 2007). Naš vzorec vsebuje 5,96 g/L skupnih kislin, kar ga uvršča na spodnjo mejo pričakovane vsebnosti kislin.

4.2 REZULTATI ANALIZ MLADEGA VINA

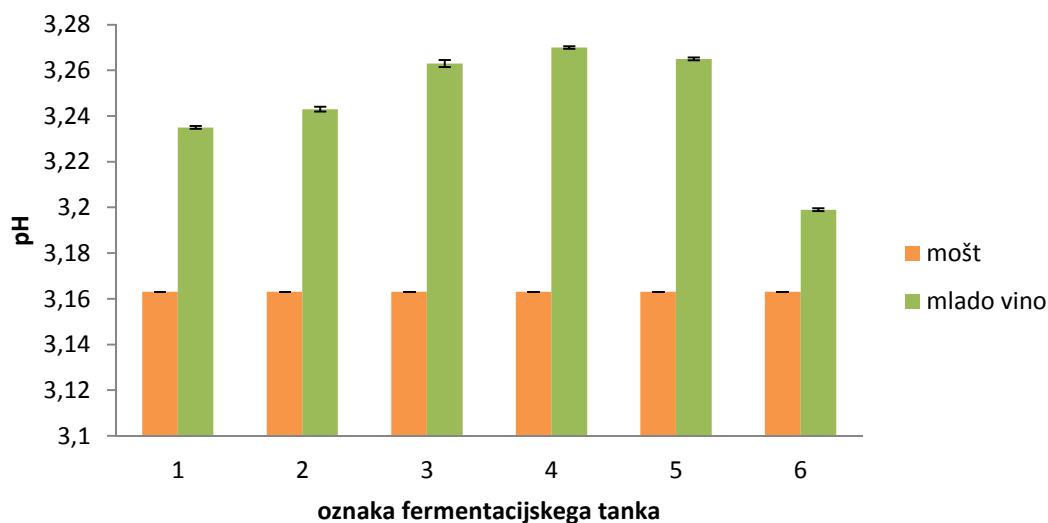
4.2.1 pH mladega vina

Na sliki 2 so predstavljene pH vrednosti vzorcev mladega vina.



Slika 2: Vrednosti pH v vzorcih mladega vina

Vse izmerjene vrednosti so bile nižje od pH 3,6 kar je za vina ugodno. Vino z vrednostjo pH nad 3,6 bi bilo podvrženo negativnim biološko-kemijskim reakcijam (Šikovec, 1996).



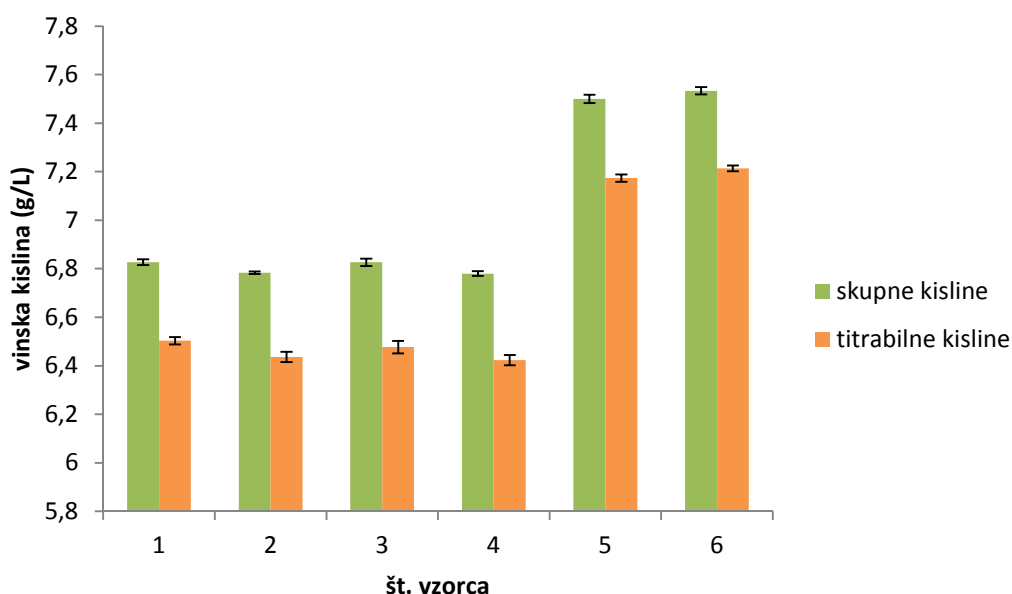
Slika 3: Primerjava pH vrednosti mošta in mladega vina

Vrednost pH v mladem vinu je praviloma večja od vrednosti pH v moštu (Košmerl in Kač, 2007). To drži tudi za vse naše vzorce, katerih vrednosti pH so med 3,20 in 3,27, medtem ko smo v moštu izmerili pH 3,16.

4.2.2 Skupne in titrabilne kisline

Pri vzorcih 1 in 2 je za titracijo uporabljena koncentracija baze $c(\text{NaOH}) = 0,10005 \text{ M}$, pri vzorcih 3, 4, 5, 6 pa je $c(\text{NaOH}) = 0,10294 \text{ M}$.

Na sliki 4 so predstavljene vrednosti skupnih in titrabilnih kislin, izražene kot masna koncentracija vinske kisline v g/L.

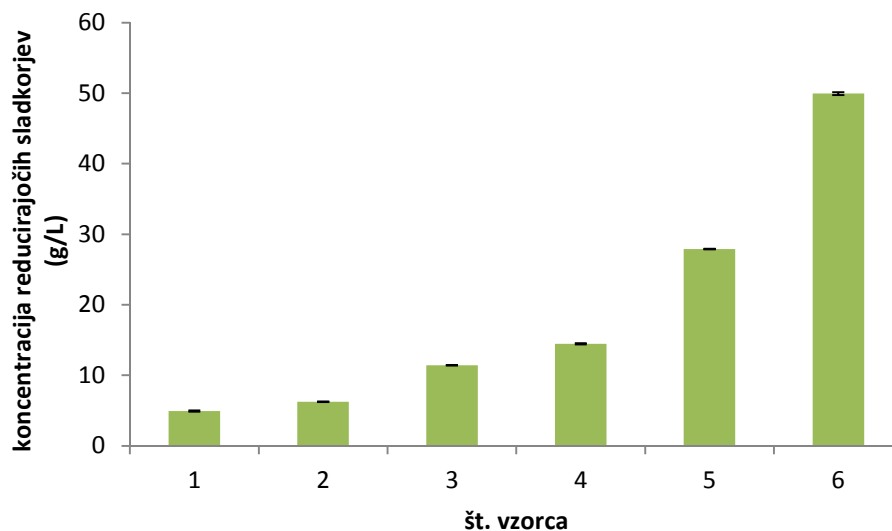


Slika 4: Skupne (TK₂) in titrabilne (TK₁) kisline v mladem vinu

V fermentacijskih tankih 1, 2, 3 in 4, kjer je AF potekala z izolatom alkoholnih kvasovk, so se gibale vrednosti izmerjenih masnih koncentracij skupnih kislin okoli 6,8 g/L, titrabilnih pa okoli 6,5 g/L. V fermentacijskih tankih 5 in 6, kjer nismo dodali izolata avtohtonih kvasovk, so skupne in titrabilne kisline približno za 1 g/L večje kot v tankih z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk. Temperatura fermentacije ni imela bistvenega vpliva na vsebnost kislin. Vsi rezultati so znotraj pričakovanih vrednosti med 6 in 9 g vinske kisline/L in presegajo minimalno vrednost vsebnosti skupnih (titrabilnih) kislin, ki po Pravilniku (Pravilnik o spremembah ..., 2004) znaša 3,5 g/L. Pričakovano so masne koncentracije skupnih in titrabilnih kislin v vinih večje kot so bile v moštu, saj se poleg kislin, ki pridejo v vino z grozdem nastajajo tudi nove organske kisline, ki jih proizvajajo kvasovke med AF.

4.2.3 Reducirajoči sladkorji

Na sliki 5 so predstavljene koncentracije reducirajočih sladkorjev v g/L, določene s titracijsko metodo po Rebeleinu. Pri vzorcu 6 je bila zaradi visoke koncentracije reducirajočih sladkorjev potrebna razredčitev vzorca, ki je pri rezultatih že upoštevana.



Slika 5: Koncentracije reducirajočih sladkorjev v vzorcih mladega vina

Glede na koncentracijo reducirajočih sladkorjev mirna vina delimo v kategorije suhih, polsuhih, polsladkih in sladkih vin. Suha vina so tista, katerih koncentracija reducirajočih sladkorjev ne presega 9 g/L, pod pogojem, da koncentracija skupnih kislin, izražena v gramih vinske kisline na liter, ni več kot za 2 g/L manjša od koncentracije reducirajočih sladkorjev. Polsuha so tista vina, ki presegajo koncentracijo reducirajočih sladkorjev suhih vin, vendar je ta manjša od 12 g/L, oziroma ne presega 18 g/L pod pogojem, da koncentracija skupnih kislin ni več kot za 10 g/L manjša od koncentracije reducirajočih sladkorjev. Polsladka so tista vina, katerih koncentracije reducirajočih sladkorjev presegajo polsuha vina, vendar so manjša od 45 g/L. Vina s koncentracijo reducirajočih sladkorjev, večjo od 45 g/L, pa uvrščamo med sladka vina (Košmerl in Kač, 2007).

Naše vzorce razvrstimo v naslednje kategorije:

V vzorcih vina 1 in 2 smo izmerili koncentracije reducirajočih sladkorjev 4,9 in 6,2 g/L. To je manj kot 9 g/L, kar uvršča vzorca med suha vina.

V vzorcu 3 smo izmerili koncentracijo reducirajočih sladkorjev 11,5 g/L. Ker koncentracija reducirajočih sladkorjev ne presega 12 g/L je vzorec 3 polsuho vino.

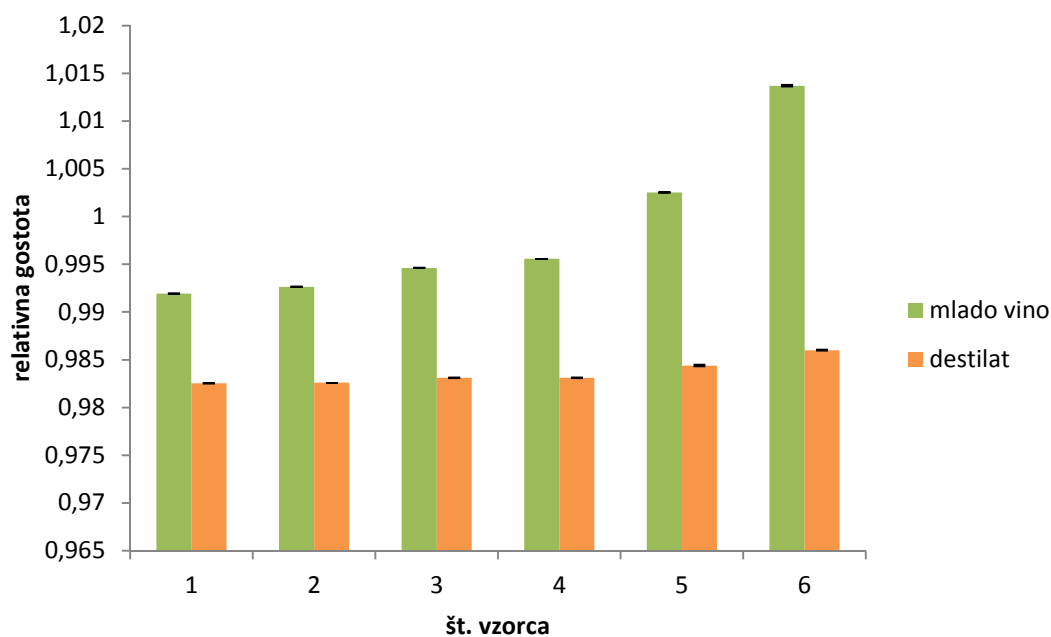
V vzorcu 4 smo izmerili koncentracijo reducirajočih sladkorjev 14,5 g/L. Vzorec 4 je zato polsuho vino, saj ima koncentracijo reducirajočih sladkorjev pod 18 g/L, koncentracija skupnih kislin pa ni za več kot 10g/L manjša od koncentracije reducirajočih sladkorjev.

V vzorcu 5 smo izmerili koncentracijo recudirajočih sladkorjev 28 g/L. Koncentracija reducirajočih sladkorjev je večja od 18 g/L a manjša od 45 g/L, zato je vzorec polsladko vino.

V vzorcu 6 smo izmerili koncentracijo reducirajočih sladkorjev 50 g/L. Koncentracija reducirajočih sladkorjev je večja od 45 g/L, zato je vzorec 6 sladko vino.

4.2.4 Relativna gostota, ekstrakt in alkohol

Na sliki 6 so predstavljene vrednosti relativne gostote mladega vina in relativne gostote alkoholnega destilata:

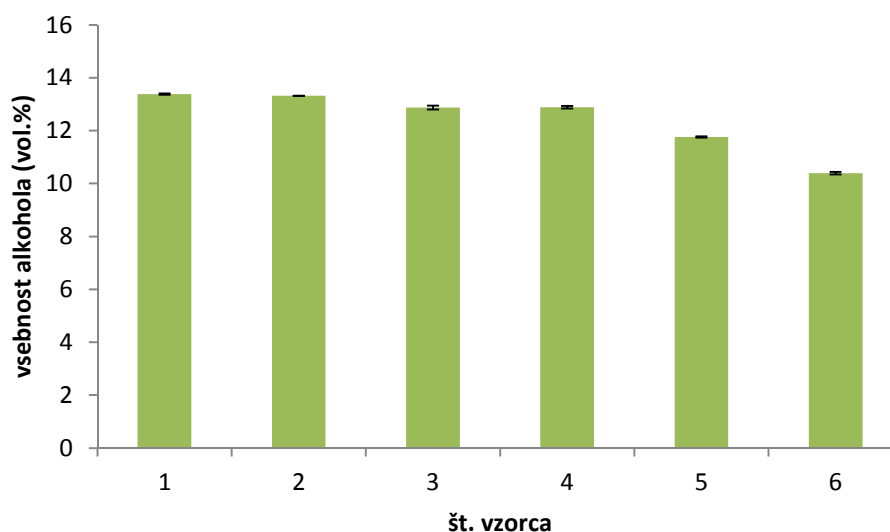


Slika 6: Relativne gostote vzorcev vina in njihovih destilatov

Na gostoto vina vplivajo vse v vodi raztopljene snovi, te imajo lahko večjo gostoto od vode (sladkorji, kisline, glicerol) ali pa nižjo (alkohol). Suha vina imajo relativno gostoto blizu 1, izjema so suha in hkrati alkoholno bogata vina, ki imajo relativno gostoto občutno manjšo od 1 (Košmerl in Kač, 2007). V to kategorijo sodita tudi naša vzorca 1 in 2, pri katerih smo izmerili relativno gostoto 0,99193 in 0,99265.

Vina s preostankom sladkorja imajo praviloma relativno gostoto večjo od 1 (Košmerl in Kač, 2007). V to kategorijo sodita naša vzorca 5 in 6, pri katerih smo izmerili relativno gostoto 1,00254 in 1,01369. V vzorcih 3 in 4 smo izmerili relativno gostoto 0,99462 in 0,99599, vzorca imata manjši ostanek sladkorja, vendar sta hkrati alkoholno bogata, zato je relativna gostota nekoliko manjša od vzorca 1.

Na sliki 7 so predstavljene koncentracije alkohola.



Slika 7: Vsebnost alkohola v vzorcih mladega vina

Ko govorimo o koncentraciji alkohola v vinu, s tem mislimo etanol, ki nastane kot glavni produkt AF s kvasovkami iz sladkorjev v moštu. Običajno ves razpoložljiv sladkor ne povre v etanol, zato je njegova koncentracija manjša od pričakovane (Košmerl in Kač, 2007).

Naši vzorci so povreli različne količine sladkorja, kar se kaže v različnih koncentracijah alkohola v mladem vinu. Vzorcem 1, 2, 3 in 4 je bil dodan izolat avtohtone kvasovke, ki so prispevale k boljši fermentaciji sladkorjev v moštu. Kot rezultat smo dobili alkoholno bogata vina z vsebnostjo alkohola med 12,8 in 13,4 vol.%. V vzorcih 5 in 6, ki sta fermentirala brez dodanih kvasovk, smo izmerili vsebnost alkohola 10,4 in 11,8 vol.%, kar je občutno nižje kot pri ostalih vzorcih. Na večjo razliko med vzorcema 5 in 6 je vplivala temperatura, in sicer je vzorec 5, pri fermentacijski temperaturi 20 °C, imel večjo vsebnost alkohola. Pri vzorcih, kjer je bila dodana kvasovka, pa je razlika med vzorci, ki so fermentirali pri različni temperaturi manj očitna.

Koncentracije skupnega suhega ekstrakta (SE) sestavljajo vse pri 100 °C nehlapne komponente vina. Gre za sladkorje, fiksne kisline, organske soli... Izračunane vrednosti so predstavljene v preglednici 2.

Preglednica 2: Skupni suhi ekstrakt (SE)

VZOREC	1	2	3	4	5	6
SE (g/L)	24,18	25,92	29,73	32,21	46,86	71,66

Ker je SE izračunan iz relativnih gostot vzorcev mladega vina in relativnih gostot njihovih destilatov, ni presenetljivo, da so razlike med vzorci velike. Večje vrednosti pri vzorcih 5 in 6 je pripisati visokemu preostanku nepovretega sladkorja oziroma nizki alkoholni stopnji.

Ta parameter je za nas pomemben, saj iz SE vrednosti in koncentracije reducirajočih sladkorjev izračunamo sladkorja prosti ekstrakt v vinu. Iz vrednosti lahko sklepamo na začetno vsebnost sladkorja v moštu. Razmerje med alkoholom in SE lahko uporabimo za ugotavljanje potvorb vina pred stekleničenjem (dodatek vode, alkohola ali sladkorja) (Košmerl in Kač, 2007).

4.2.5 Sladkorja prosti ekstrakt

V preglednici 3 so predstavljene masne koncentracije sladkorja prostega ekstrakta (SPE), izračunane kot razlika med koncentracijo SE in koncentracijo reducirajočih sladkorjev.

Preglednica 3: Sladkorja prosti ekstrakt (SPE)

VZOREC	1	2	3	4	5	6
SPE (g/L)	19,25	19,67	18,31	17,76	18,96	21,71

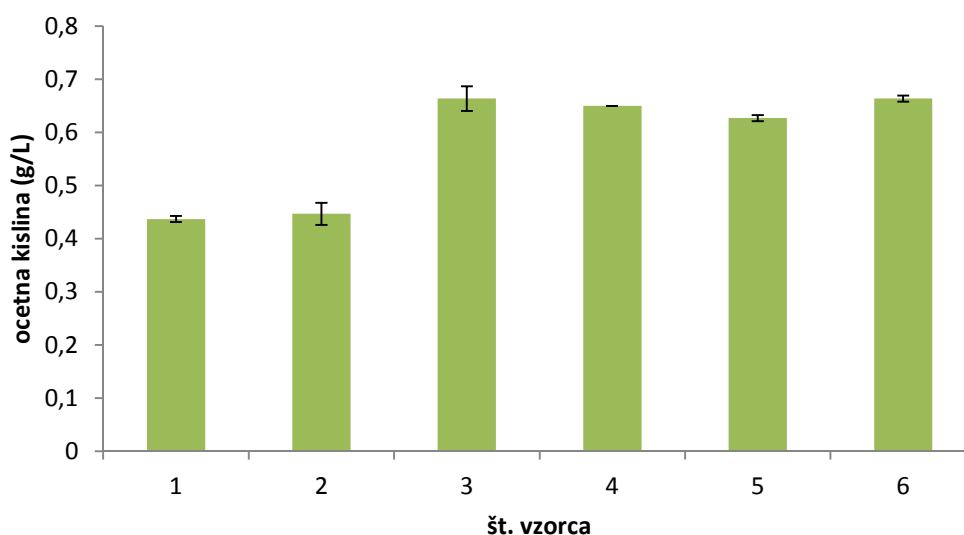
Vsebnost ekstrakta je odvisna od sorte, zrelosti, načina trgatve in pogojev vinifikacije. Vpliv različnih sevov čiste kulture kvasovk v primerjavi s spontano fermentacijo ni statistično značilen. Vsebnost SPE je med 7 in 30 g/L, v povprečju 20 g/L (Košmerl in Kač, 2007).

Vrednosti SPE v naših vzorcih se gibljejo okoli 20g/L. Vzorci 1, 2 in 5 so fermentirali pri temperaturi 20 °C in ne glede na to, da smo v vzorce 1 in 2 dodali izolat avtohtonih kvasovk, v vzorec 5 pa ne, so si vrednosti med 18,96 in 19,67 g/L med seboj zelo blizu. Vzorci 3, 4 in 6 so fermentirali pri temperaturi 15 °C, njihove vrednosti SPE so v razponu med 17,76 in 21,71 g/L, pri čemer je vrednost SPE v vzorcu 6, kjer je potekala spontana fermentacija, najvišja od vseh vzorcev.

Minimalna vrednosti SPE je zakonsko predpisana, in sicer za deželno vino s priznano geografsko oznako (PGO) za bela vina ne sme biti nižja od 16 g/L, za kakovostno vino z zaščitenim geografskim poreklom (ZGP) ne sme biti manjša od 18 g/L in vrhunska ZGP ne sme biti manjša od 20 g/L. Naši vzorci bi se glede na vsebnost SPE okoli 18 in 19 g/L lahko uvrščali med kakovostna vina ZGP, vzorec 6 pa z več kot 21 g/L med vrhunska vina ZGP. Vrednost SPE je le eden izmed parametrov, ki morajo biti izpolnjeni za podelitev naziva PGO in ZGP. Najpomembnejša za uvrstitev med te kategorije je organoleptična ocena vina (Pravilnik o postopku ..., 2000).

4.2.6 Hlapne kisline

Na sliki 8 so predstavljene masne koncentracije hlapnih kislin, izražene kot masna koncentracija očetne kisline v g/L.

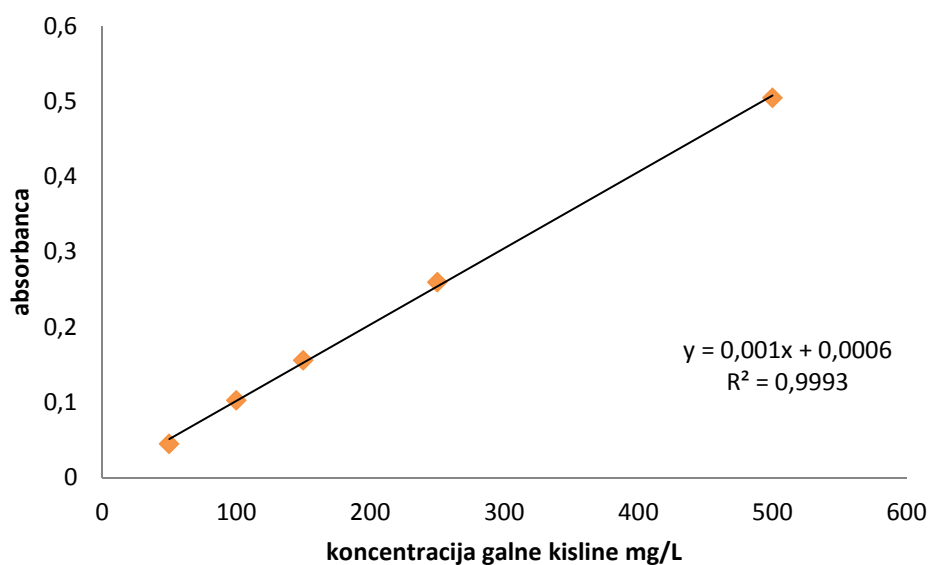


Slika 8: Masne koncentracije hlapnih kislin, izražene kot očetna kislina

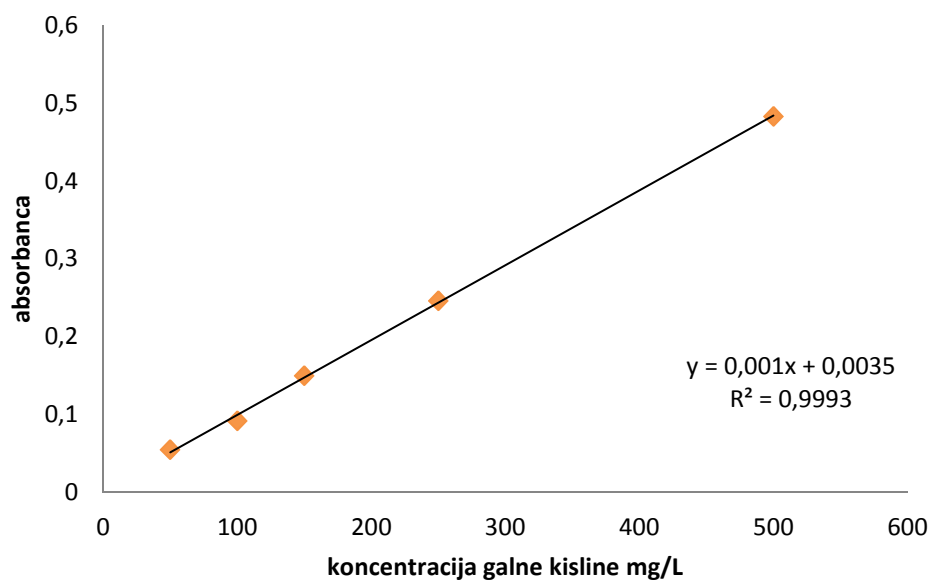
Največja dovoljena koncentracija hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina v g/L, je pri belih vinih 1,0 g/L (Pravilnik o spremembah ..., 2004). Vsi naši vzorci ustrezajo predpisom Pravilnika. Najmanjšo koncentracijo hlapnih kislin sta imela vzorca 1 in 2, ki sta fermentirala z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk pri 20 °C. V vzorcih smo izmerili 0,45 g/L hlapnih kislin. Pri vzorcih, ki so fermentirali pri temperaturi 15 °C in vzorcih brez dodanega izolata avtohtonih kvasovk, so se izmerjene vrednosti koncentracije hlapnih kislin gibale blizu 0,65 g/L. Ta koncentracija je že na spodnji meji zaznave očetno kislinskega tona. Napako in bolezen vina (očetno kislinski ton ali cik) lahko zaznamo senzorično že med 0,6 - 0,9 g/L, kar je manj kot je zakonsko dovoljena maksimalna koncentracija (Košmerl in Kač, 2007).

4.2.7 Fenolne spojine

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih mladega vina smo izračunali iz enačbe, ki smo jo dobili iz umeritvene krivulje. Ker vsi naši vzorci niso bili analizirani istega dne, imamo dve umeritveni krivulji predstavljeni na sliki 9 in 10.



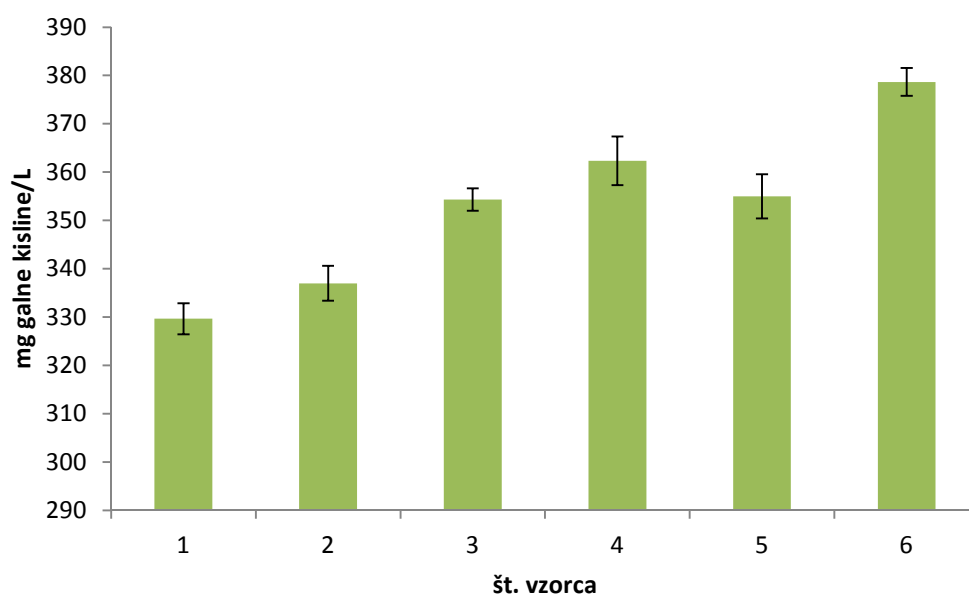
Slika 9: Umeritvena krivulja za izračun fenolnih spojin za vzorca 1 in 2



Slika 10: Umeritvena krivulja za izračun fenolnih spojin za vzorce 3, 4, 5 in 6

Fenolne spojine prispevajo k barvi in stabilnosti vina, v večjih koncentracijah pa so odgovorne z atrpkost in grenek okus. V mošt in vino preidejo iz grozdnih jagod, zato na njihovo koncentracijo vpliva sorta vinske trte, čas kontakta grozdnega soka s kožicami in pečkami, koncentracija etanola in temperatura fermentacije. Razpon med 150 in 400 mg skupnih fenolnih spojin ustreza belim vinom, povprečna koncentracija je 225 mg/L (Košmerl in Kač, 2007).

Na sliki 11 so predstavljene masne koncentracije fenolnih spojin, izražene v mg galne kisline/L.



Slika 11: Koncentracija fenolnih spojin v vzorcih mladega vina

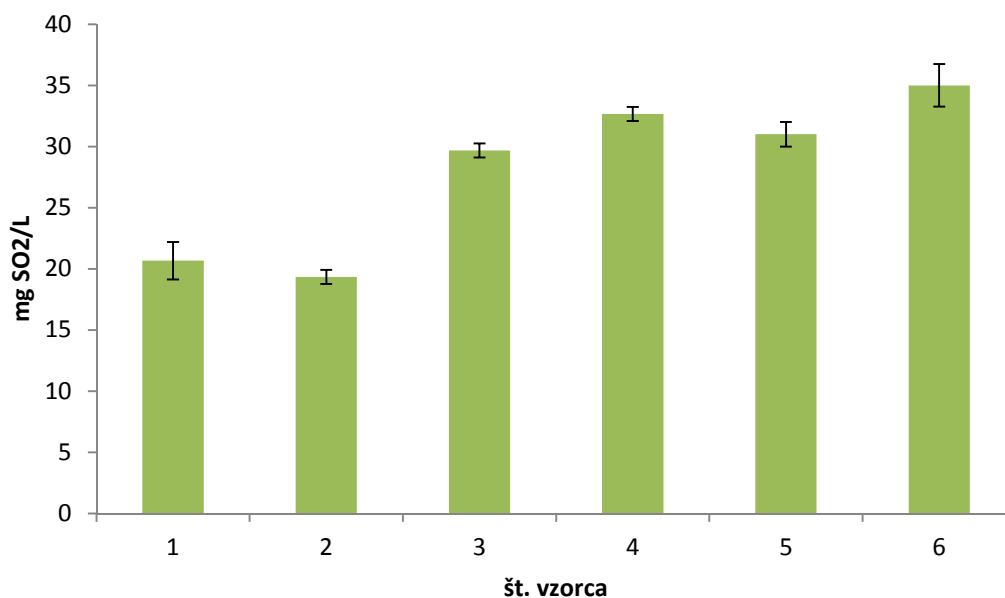
Vsi analizirani vzorci imajo več fenolnih spojin, kot je povprečje za bela vina, vendar so znotraj pričakovanih vrednosti. Vzorca 1 in 2 imata v primerjavi z drugimi vzorci manjšo koncentracijo fenolnih spojin, in sicer 330 in 337 mg/L. Višja temperatura fermentacije je vplivala na manjšo končno koncentracijo fenolnih spojin v vzorcih, v primerjavi s fermentacijo pri nižji temperaturi. Zanimivo je, da imata vzorca 3 in 4, ki sta vrela pri nižji temperaturi, a z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk, primerljivo koncentracijo fenolnih spojin kot vzorec 5, ki je vrel pri višji temperaturi z naravno prisotno mikrofloro. Vrednosti teh vzorcev so se gibale med 354 in 362 mg/L. Največjo koncentracijo fenolnih spojin smo izmerili v vzorcu 6, ki je fermentiral pri 15 °C brez dodatka kvasovk, in sicer 378 mg/L.

4.2.8 Skupni žveplov dioksid

V vzorcih mladega vina smo skupni SO₂ določili po Ripperjevi metodi.

Skupni SO₂ je definiran kot vsota vseh oblik SO₂ v vinu - molekularna, bisulfitna in sulfitna, bodisi v prosti ali vezani obliki. Po Pravilniku (Pravilnik o spremembah ..., 2004) koncentracija skupnega SO₂ v belih vinih, ki imajo do 5 g/L reducirajočih sladkorjev, ne sme presegati 210 mg SO₂/L, pri belih vinih s koncentracijo reducirajočih sladkorjev nad 5 g/L pa 260 mg SO₂/L (Košmerl in Kač, 2007).

Na sliki 12 so predstavljeni rezultati meritev skupnega SO₂ v vzorcih mladega vina



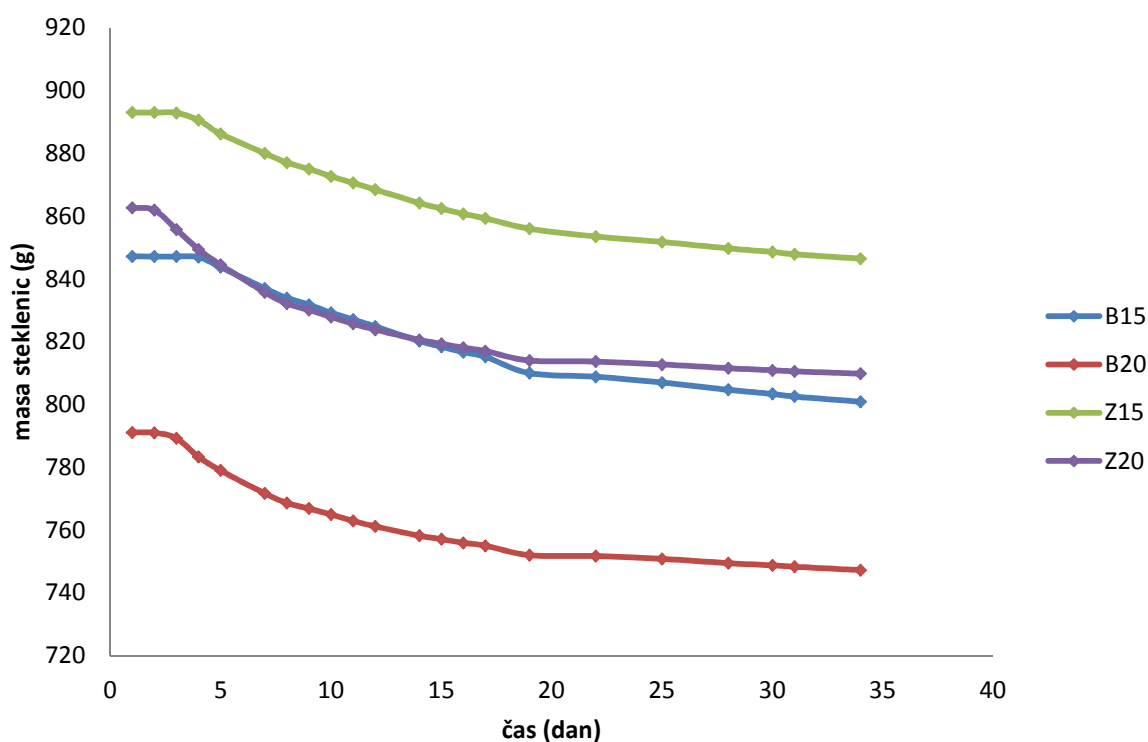
Slika 12: Koncentracije skupnega SO₂ v vzorcih mladega vina

Vsi naši vzorci imajo mnogo manjšo koncentracijo SO₂, kot je dovoljena predpisana vrednost 260 mg SO₂/L. V vzorcih 1 in 2, ki sta fermentirala vino z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk pri temperaturi 20 °C, smo izmerili 19 in 20 mg SO₂/L. Koncentracije so pri teh dveh vzorcih sta manjše kot pri vzorcih 3 in 4, ki sta fermentirala z dodano kvasovko pri 15 °C in vzorcu 5, ki je fermentiral brez izolata avtohtone kvasovke pri 20 °C. Izmerjene koncentracije teh vzorcev so se gibale med 29 in 32 mg SO₂/L. Največjo koncentracijo SO₂, 35 mg/L, smo izmerili v vzorcu 6, ki je fermentiral brez dodanih kvasovk pri 15 °C.

4.3 FERMENTACIJSKE STEKLENICE

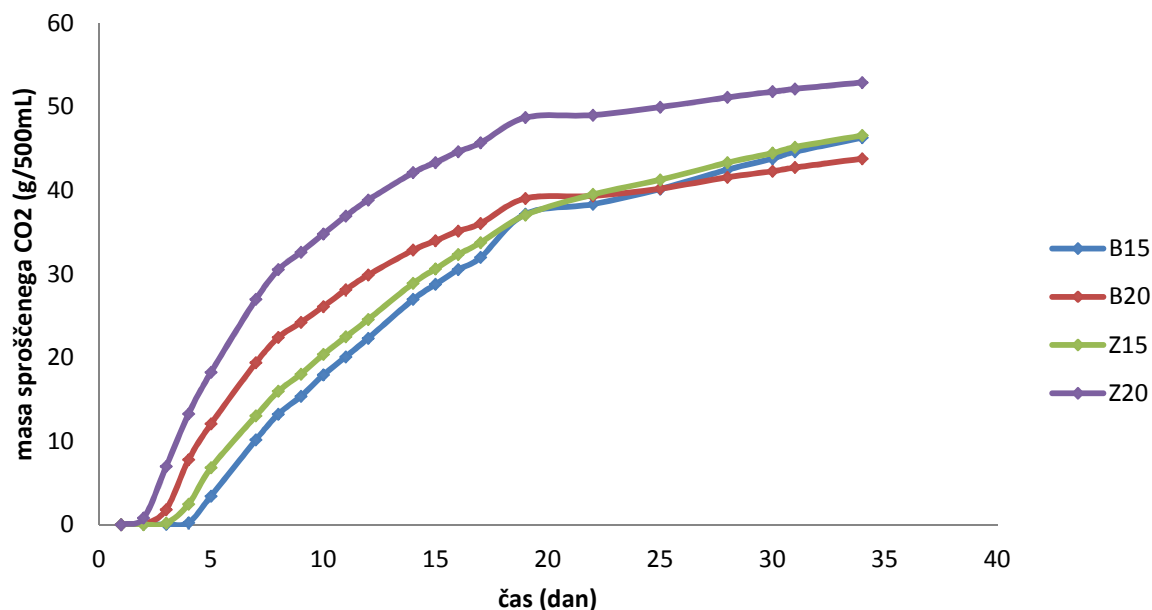
Na slikah 13 in 14 lahko vidimo, kako se zaradi sproščenega CO₂ spreminja masa vrelnih steklenic.

Z oznako B15 je označena fermentacijska steklenica, ki je pri 15 °C fermentirala brez dodanih kvasovk. Oznaka B20 predstavlja fermentacijsko steklenico, ki je fermentirala brez dodanih kvasovk pri 20 °C. Oznaki Z15 in Z20 sta fermentacijski steklenici, katerima je bil dodan izolat avtohtone kvasovke. Številka zraven oznake Z pomeni, pri kateri temperaturi je potekala fermentacija.



Slika 13: Sprememba mase fermentacijskih steklenic med alkoholno fermentacijo

Legenda: B15 - vzorec z naravno mikrofloro pri 15 °C, B20 - vzorec z naravno mikrofloro pri 20 °C, Z15 - vzorec z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk pri 15 °C, Z20 - vzorec z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk pri 20 °C



Slika 14: Masa sproščenega CO₂ v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije

Legenda: B15 - vzorec z naravno mikrofloro pri 15 °C, B20 - vzorec z naravno mikrofloro pri 20 °C, Z15 - vzorec z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk pri 15 °C, Z20 - vzorec z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk pri 20 °C

Pričakovano je AF najhitreje potekla v vzorcu Z20, ki je imel dodan izolat avtohtonih kvasovk, in pri temperaturi fermentacije 20 °C. Ob koncu fermentacije je ta vzorec sprostil tudi največ CO₂. Zanimivo je, da je kljub dodatku izolata avtohtonih kvasovk v vzorcu Z15 fermentacija potekala počasneje kot v vzorcu B20, ki je vseboval le naravno prisotno mikrofloro in je fermentiral pri 20 °C. Najpočasneje je, kot je bilo pričakovano, potekla fermentacija v vzorcu B15, ki je fermentiral s prisotno naravno mikrofloro pri 15 °C. Zanimivo je, da so ob koncu fermentacije vzorci B15, B20 in Z15 kljub različnim začetkom in hitrostim fermentacije sprostili v 30 dneh skoraj enake količine CO₂. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je bila za hiter začetek fermentacije pomembna predvsem fermentacijska temperatura, saj je tudi pri dodatku izolata avtohtonih kvasovk boljši rezultati vrenja opažen samo pri višji temperaturi vrenja.

4.4 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE

Rezultati deskriptivne analize - profiliranje po lastni presoji:

V vzorcih TANK1 in 2 je vino, ki je fermentiralo z izolatom avtohtone kvasovke pri 20 °C.
V vzorcih TANK3 in 4 je vino, ki je fermentiralo z izolatom avtohtone kvasovke pri 15 °C.
V vzorcu TANK5 je vino, ki je fermentiralo z avtohtono mikrofloro pri 20 °C.
V vzorcu TANK6 je vino, ki je fermentiralo z avtohtono mikrofloro pri 15 °C.

Vzorec TANK1: Vino je bistro in zlato rumene barve ter ima nežen cvetlični vonj, ki z vrtenjem kozarca postane intenzivnejši. Po okusu vino deluje polno, z lepo zaokroženo kislino. Bogat alkohol nekoliko izstopa.

Vzorec TANK2: Vino ima lepo bistrost in zlato barvo. Nežen cvetlični vonj ob vrtenju kozarca hitro postane intenziven, hitro hlapljiv. V primerjavi z vzorcem 1 je elegantnejše, ima boljšo aromo in skupaj z vonjem deluje bolj harmonično.

Vzorec TANK3: Vino je zadovoljive bistrosti in zlato rumene barve. Vonj je bolj zaprt, a z vrtenjem kozarca poleg cvetličnega vonja zaznamo tudi sadne note. Vino je pitno in ima dobro razmerje med kislino in sladkorjem. Je sortno vino in deluje značilno za renski rizling iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija.

Vzorec TANK4: Vino ima zadovoljivo bistrost, vendar slabšo kot pri vinih 1, 2 in 3. Vino je zlato rumene barve in ima lepo cvetico. Vino deluje sveže, je sortno, aromatično, kisline in sladkorji so skladne.

Vzorec TANK5: Vino je slabše bistrosti. Barva vina je zlato rumena, vonj je zaprt. Ob vrtenju kozarca zaznamo nežno cvetico. Vino je prijetnega sladkega okusa.

Vzorec TANK6: Vino je precej motno in zlato rumene barve ter ima nežno cvetico. V okusu sladkor močno izstopa, vino deluje že skoraj osladno.

Pri rizlingih se po izkušnjah dobrih kletarjev razvije prijetnejša aroma pri temperaturi med 15 in 18 °C (Nemanič in sod., 2001). V našem primeru sta vzorca vina v TANK3 in TANK4, ki sta fermentirala z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk pri 15 °C, imela boljšo aromatičnost in sortnost v primerjavi z ostalimi vzorci.

Senzorično nas je najbolj prepričalo vino, ki je fermentiralo z dodanim izolatom avtohtone kvasovke pri 20 °C. Vino je bilo najbolj bistro, z nežnim cvetličnim vonjem in lepo zaokroženo kislino. Vino je delovalo polno. Vino je bilo harmonično z nekoliko izstopajočim alkoholom. Vina, ki so fermentirala z dodanim izolatom avtohtone kvasovke pri 15 °C, so bila manj bistra, z bolj zaprtim vonjem, pripisali pa smo jim boljšo sortnost, nekateri izmed poskusovalcev so tudi zagovarjali ostanek nepovretega sladkorja kot značilnega za renski rizling iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija. Vino je delovalo manj harmonično kot pri fermentaciji pri 20 °C. Vsi smo si bili enotni, da senzorično vina, ki so fermentirala le z avtohtono mikrofloro, dala manj kakovostna vina, ki so bila preveč motna in s prevelikim ostankom sladkorja.

4.5 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

Vrednost p_T predstavlja statistična značilnost vpliva temperature, p_k pa statistična značilnost vrste kvasovke, kjer BREZ označuje fermentacijo z naravno prisotno mikrofloro, KVAS pa uporabo izolata avtohtone kvasovke.

Vrednosti $p \leq 0,001$ pomenijo statistično zelo visoko značilen vpliv; $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv. Statistično neznačilen vpliv je med vzorci, kjer je $p > 0,05$. Srednje vrednosti z različno črko (^{a,b}) znotraj vrstice pomenijo značilnost razlik med temperaturami, srednje vrednosti z različno črko (^{A,B}) znotraj stolpca pa značilnost razlik med uporabo kvasovk med AF.

Statistična analiza je pokazala, da se večina vzorcev med sabo statistično značilno razlikuje, saj so bile vrednosti p_T in $p_k < 0,05$. Statistična analiza je pokazala, da ima uporaba kvasovke za AF pri 15 °C neznačilen vpliv na koncentracijo hlapnih kislin. Na koncentracijo skupnih kislin temperatura alkoholne fermentacije, ne glede na to, ali pri AF uporabimo izolat ali naravno prisotno mikrofloro, nima vpliva. Na koncentracijo titrabilnih kislin temperatura AF nima vpliva pri uporabi izolata avtohtone kvasovke. Za vse ostale parametre pa se med uporabo kvasovke in temperaturo AF vrednosti statistično značilno razlikujejo.

Preglednica 4: Statistična analiza vpliva temperature fermentacije in uporabo izolata avtohtone kvasovke ali naravno prisotne mikroflore na fizikalno-kemijske parametre mladega vina

parameter	kvasovka	Temperatura (°C)		p_T vrednost
		15	20	
ALK	BREZ	$10,39 \pm 0,05^{bB}$	$11,76 \pm 0,02^{aB}$	<0,001
	KVAS	$12,88 \pm 0,05^{bA}$	$13,35 \pm 0,04^{aA}$	<0,001
	p_k vrednost	<0,001	<0,001	
F	BREZ	$378,7 \pm 2,9^{aA}$	$355,0 \pm 4,6^b$	0,0016
	KVAS	$358,3 \pm 5,6^{aB}$	$333,3 \pm 5,0^b$	<0,001
	p_k vrednost	<0,001	0,0004	
HK	BREZ	$0,66 \pm 0,01^a$	$0,63 \pm 0,01^{bA}$	0,0015
	KVAS	$0,66 \pm 0,02^a$	$0,44 \pm 0,01^{bB}$	<0,001
	p_k vrednost	0,5263	<0,001	
PH	BREZ	$3,20 \pm 0,00^{bB}$	$3,26 \pm 0,00^a$	<0,001
	KVAS	$3,27 \pm 0,00^A$	$3,24 \pm 0,00$	<0,001
	p_k vrednost	<0,001	<0,001	
RG	BREZ	$1,014 \pm 0,00^{aA}$	$1,003 \pm 0,00^{bA}$	<0,001
	KVAS	$0,995 \pm 0,00^B$	$0,992 \pm 0,00^B$	<0,001
	p_k vrednost	<0,001	<0,001	
RGA	BREZ	$0,9860 \pm 0,00^{aA}$	$0,9844 \pm 0,00^{bA}$	<0,001
	KVAS	$0,9831 \pm 0,00^{aB}$	$0,9826 \pm 0,00^{bB}$	<0,001
	p_k vrednost	<0,001	<0,001	
RS	BREZ	$49,93 \pm 0,21^{aA}$	$27,88 \pm 0,06^{bA}$	<0,001
	KVAS	$12,93 \pm 1,66^{aB}$	$5,59 \pm 0,72^{bB}$	<0,001
	p_k vrednost	<0,001	<0,001	
SK	BREZ	$7,53 \pm 0,02^A$	$7,50 \pm 0,02^A$	0,0668
	KVAS	$6,80 \pm 0,03^B$	$6,81 \pm 0,03^B$	0,9158
	p_k vrednost	<0,001	<0,001	
SZD	BREZ	$35,00 \pm 1,73^{aA}$	$31,00 \pm 1,00^{bA}$	0,0257
	KVAS	$31,17 \pm 1,72^{aB}$	$20,00 \pm 1,26^{bB}$	<0,001
	p_k vrednost	0,0163	<0,001	
TK	BREZ	$7,21 \pm 0,01^{aA}$	$7,17 \pm 0,02^{bA}$	0,0224
	KVAS	$6,45 \pm 0,04^B$	$6,47 \pm 0,04^B$	0,3828
	p_k vrednost	0,0007	<0,001	

Legenda: ALK - vsebnost alkohola (vol.%), F - koncentracija fenolnih spojin, HK - koncentracija hlapnih kislin, PH - vrednost pH, RG - relativna gostota vzorca, RGA - relativna gostota destilata, RS - koncentracija reducirajočih sladkorjev, SK - koncentracija skupnih kislin, SZD - koncentracija skupnega žveplovega dioksida, TK - koncentracija titrabilnih kislin

5 SKLEPI

Ugotovili smo, da so se vina, ki so bila proizvedena z dodatkom izolata avtohtonih kvasovk, in tista z avtohtono mikrofloro močno razlikovala po volumskem deležu alkohola. Vzorci v tankih 1, 2, 3 in 4, ki so fermentirali z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk, so vsebovali med 12,8 in 13,4 vol.% alkohola, medtem ko sta vzorca iz tankov 5 in 6 vsebovala le 11,8 in 10,4 vol.% alkohola. Prav tako ima na delež alkohola v vinu statistično zelo visoko značilen vpliv tudi temperatura fermentacije. Vina, ki so bila fermentirana z dodatkom izolata pri 20 °C, so bila alkoholno najbolj bogata, medtem ko je vino, fermentirano z avtohtono mikrofloro pri 15 °C, imelo najmanjši volumski delež alkohola.

Tudi na relativno gostoto vina in relativno gostoto alkoholnega destilata značilno vpliva tako temperatura fermentacije, kot tudi uporaba različne mikroflore pri fermentaciji vin. Najmanjšo relativno gostoto je imelo vino, ki je fermentiralo pri 20 °C z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk, in sicer je bila gostota manjša od 1. Največjo gostoto je imel vzorec 6, ki je fermentiral pri 15 °C z avtohtono mikrofloro, njegova gostota je bila večja od 1.

Glede na koncentracijo reducirajočih sladkorjev ločimo vina v kategorije suhih, polsuhih, polsladkih in sladkih vin. Vina, ki so bila končni produkt našega poskusa ob različnih temperaturah in kvasovkah pripadajo vsem naštetim kategorijam. S fermentacijo z izolatom avtohtonih kvasovk smo pri 20 °C pridelali suho vino, pri temperaturi 15 °C pa polsuho vino. Istočasno pase vino, ki je bilo fermentirano z avtohtono mikrofloro pri 20 °C uvršča med pol sladka, tisto s fermentacijsko temperaturo 15 °C pa v kategorijo sladkih vin.

Tudi na prisotnost fenolnih spojin v vinih ima statistično zelo visoko značilen vpliv vrsta kvasovk, s katerimi je fermentiralo vino, pa tudi temperatura fermentacije. Največ fenolnih spojin je bilo prisotnih v vinu, fermentiranem z avtohtono mikrofloro pri 15 °C, najmanj pa pri vinih, fermentiranih z izolatom avtohtonih kvasovk pri 20 °C.

Koncentracija hlapnih kislin v vinu je bila različna med vzorci, ki so fermentirali z enako mikrofloro, a pri različni temperaturi. Najbolj opazna razlika je med vinoma, ki sta fermentirala pri 20 °C z različno mikrofloro, medtem ko vina, ki so fermentirala pri 15 °C niso pokazala statistično značilnega vpliva, ne glede na to, ali je bilo vino fermentirano z avtohtono mikrofloro ali izolatom avtohtonih kvasovk.

Koncentracija skupnih in titrabilnih kislin v vinu je bila večja pri vinih, ki so fermentirala z avtohtono mikrofloro, v primerjavi s tistimi, ki so fermentirala z izolatom avtohtonih kvasovk. Ugotovili smo, da pri tem temperatura, pri kateri je potekla fermentacija, nima statistično pomembnega vpliva. Izjema so titrabilnih kisline v vinu, fermentiranem z avtohtono mikrofloro, kjer se je pri fermentaciji pri 15 °C tvorilo več kislin kot pri fermentaciji z enako mikrofloro pri 20 °C.

Na vrednost pH v vinu je vplivala fermentacija z različnima mikroflorama pri 15 °C, statistično pomemben vpliv pa je imela tudi temperatura fermentacije za vina, ki so fermentirala le z avtohtono mikrofloro. Med vini, fermentiranimi pri 20 °C, in pri vinih z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk, ni statistično pomembnega vpliva.

Na koncentracijo skupnega SO₂ v vinu vpliva tako fermentacija z različno mikrofloro kot tudi temperatura. Najbolj očitna je razlika med vini, fermentiranimi z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk in različnih temperaturah ter razlika med vini, fermentiranimi pri 20 °C z različno mikrofloro. Vino, ki je fermentiralo z izolatom avtohtonih kvasovk pri 20 °C, ima občutno manjšo koncentracijo skupnega SO₂ v primerjavi z ostalimi vini, nastalimi v poskusu.

Senzorično smo kot bolj kakovostna vina ocenili tista, ki so bila fermentirana z dodanim izolatom avtohtone kvasovke *S. cerevisiae*. Vina so bila bistrejša, s prijetnim, sortnim vonjem in bolj harmonična v primerjavi z vini, ki so fermentirala z mikrofloro, prisotno v moštu samem. Pri vinih, ki so fermentirala z dodanim izolatom kvasovke pri 20 °C, je bila dosežena boljša zaokroženost kisline in harmoničnost, kljub rahlo izstopajočemu alkoholu. Vina, ki so fermentirala z dodanim izolatom kvasovke pri 15 °C, so imela boljšo sortno aromo. Pri vinih, ki so fermentirala brez dodanih kvasovk sicer nismo zaznali napak, a so bila v primerjavi z vini, kjer smo dodali kvasni izolat, manj kakovostna zaradi prevelike motnosti in velikih ostankov sladkorja.

6 POVZETEK

S poskusom smo želeli ugotoviti, kako dodatek izolata avtohtonih kvasovk vpliva na potek fermentacije in kakovost vina renski rizling v primerjavi z avtohtono mikrofloro ter kako na fermentacijo z izolatom ali avtohtono mikrofloro vpliva različna temperatura fermentacije.

Poskus smo nastavili tako, da smo mošt sorte Renski rizling iz vinorodnega podkoliša Srednje Slovenske gorice razdelili na 6 enakih delov in ga pretočili v 35-litrške fermentacijske tanke, označene z oznakami od 1 do 6. Moštu v fermentacijskih tankih od 1 do 4 smo dodali izolat avtohtonih vinskih kvasovk *S. cerevisiae*. V tankih 5 in 6 smo pustili mikrofloro, ki je bila prisotna v moštu samem. Nastavili smo temperaturo fermentacije, in sicer v tankih 1, 2 in 5 na 20 °C in v tankih 3, 4 in 6 na 15 °C.

Za spremljanje poteka AF smo nastavili poskus v 4 fermentacijskih steklenicah, kjer smo moštu v dveh izmed njih dodali izolat avtohtonih kvasovk, drugima dvema pa pustili avtohtono mikrofloro. Po dve steklenici z različnima kulturama smo postavili v prostor s temperaturo 15 °C in 20 °C.

S tehtanjem vrelnih steklenic smo spremljali potek alkoholne fermentacije preko izgube mase steklenic kot posledice izgube CO₂ iz vzorcev. AF je pri vzorcu, ki je fermentiral pri 20 °C z dodanim izolatom avtohtonih vinskih kvasovk *S. cerevisiae*, potekla mnogo hitreje kot pri ostalih vzorcih. To je bil razlog, da smo fizikalno-kemijske analize vzorcev tank1 in tank2 opravili 8 dni pred ostalimi.

Po končani fermentaciji smo opravili fizikalno-kemijske analize, ki so pokazale velike razlike med vini, ki so fermentirali pod različnimi pogoji. Najbolj je na razlike vplivalo to, ali je vino fermentiralo z dodatkom izolata avtohtonih vinskih kvasovk *S. cerevisiae* ali le z mikrofloro, ki je bila prisotna v moštu. Vina, ki so fermentirala z dodanim izolatom, so imela po končani fermentaciji večji volumski delež alkohola, manjšo relativno gostoto, manjšo masno koncentracijo titrabilnih in skupnih kislin ter manjšo koncentracijo reducirajočih sladkorjev.

Pri ostalih fizikalno-kemijskih parametrih je bila poleg razlike med vini, ki so fermentirala z dodanim kvasnim izolatom ali ne, pomembna tudi fermentacijska temperatura. Pri vinu, ki je fermentiralo pri 20 °C z dodanim kvasnim izolatom, smo izmerili manjšo koncentracijo hlapnih kislin, manjšo koncentracijo skupnega SO₂ in manjšo koncentracijo fenolnih spojin.

Tudi senzorično analizo smo kot kakovostnejša vina prepoznali tista, ki so bila fermentirana z dodanim izolatom avtohtonih kvasovk. Vina, ki so fermentirala pri 20 °C, so bila bistrejša, s prijetnim vonjem, zaokroženo kislino, ki je delovala harmonično in alkoholno bogata. Vina, ki so fermentirala pri 15 °C, so imela boljšo sortno aromo, del pokaševalcev seje strinjal tudi s tem, da je to vino glede na volumski delež alkohola in ostanek sladkorja bolj tipično za vinorodni okoliš Štajerska Slovenija. Vina, ki so fermentirala brez dodatka kvasovk, so bila bolj motna in s prevelikim ostankom sladkorja. Ta vina niso dosegla takšne kakovosti kot vina z dodanim izolatom.

Kot delovno hipotezo smo predpostavili, da bo fermentacija z dodatkom kvasnega izolata dala boljšo kemijsko sestavo in boljše senzorične lastnosti vina kot fermentacija z avtohtono mikrofloro. To smo s poskusom in dobljenimi rezultati fizikalno-kemijskih analiz ter s senzorično analizo tudi potrdili. Predvidevali smo tudi, da bo imela višja temperatura fermentacije pozitiven vpliv na hitrost fermentacije, kar se je izkazalo za pravilno pri vzorcu, kjer je bil dodan izolat avtohtonih kvasovk.

7 VIRI

- Aranda A., Matallana E., Olmo M. 2011. *Saccharomyces* yeasts 1: Primary fermentation. V: Molecular wine microbiology. 1st ed. Carrascosa A.V., Muñoz R., González R. (eds.). Amsterdam, Academic Press/ Elsevier: 1-31
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 66-103, 124-142
- Fugelsang K. C., Edwards C.G. 2007. Wine microbiology: Practical applications and procedures. 2nd ed. Boston, Springer: 3, 84-86
- Golob T., Bertonec J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47-51
- Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj, SVA Veritas: 42-44
- Jacobson J. L. 2006. Introduction to wine laboratory practices and procedures. Boston, Springer: 119-188
- Jug T., Košuta M., Rojc A., Rusjan D. 2014. Analize grozdja in vina: Winenet, mreža sodelovanja za inovativne rešitve za izboljšanje kakovosti grozdja in vina. Nova Gorica, KGZS: 52 str.
- Košmerl T. 2007. Bistrenje, čiščenje in stabilizacija vina pred stekleničenjem: Laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49-50
- Košmerl T., Kač M. 2007. Osnove kemijske analize mošta in vina: Laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 3. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.
- Manzanares P., Valles S., Viana F. 2011. Non-*Saccharomyces* yeasts in the wine making process. V: Molecular wine microbiology. 1st ed. Carrascosa A.V., Muñoz R., González R. (eds.). Amsterdam, Academic Press/ Elsevier: 85-110
- Moreno J., Peinado R. 2012. Enological chemistry. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 41-175
- Nemanič J., Kocjančič M., Martinčič J., Bavčar D. 2001. Trgatev, predelava grozdja in nega vina. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 12-12

Nemanič J. 2006. Ali razumemo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 24-52, 60-61

Nemanič J. 2011. Učbenik Vinarstvo: Višješolski strokovni program Upravljanje podeželja in krajine: gradivo za 2. letnik. Ljubljana, Zavod IRC: 28-71
http://www.impletum.zavod-irc.si/docs/Skriti_dokumenti/Vinarstvo-Nemanic.pdf
(junij 2016)

Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3862

Pravilnik o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru. Priloga I. : Geografske označbe pridelovalnih območij, manjših od vinorodnih okolišev. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 17, 49: 6732-6739

Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 127: 15271-15272

Rajher Z. 1994. Korenine Slovenskega vinogradništva. V: Vodnik po slovenskih vinorodnih okoliših. Prunk J. (ed.). Ljubljana, Založba GRAD: 10-22

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. 2006a. Handbook of enology. Vol. 1: The microbiology of wine and vinification. Chichester, John Wiley and Sons: 53-78, 397-444

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2006b. Handbook of enology. Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester, John Wiley and Sons: 1-230

SAS Software. 1999. Version 8.01. Cary, SAS Institute Inc.: Software

Simčič Z. 1987. Vino med ljudsko modrostjo in sodobno znanostjo. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 25-28, 63-69

Skaza T. 1994. Srednje Slovenske gorice in Haloze z obrobim pogorjem. V: Vodnik po slovenskih vinorodnih okoliših. Prunk J. (ur.). Ljubljana, Založba GRAD: 201-214

Smole Možina S. 2000. Eksperimentalne vaje iz živilske mikrobiologije. Splošna mikrobiološka tehnika: skripta in delovni zvezek za študente I. letnika živilsta. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 25 str.

Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, Kmečki glas: 76-182

Zabukovec P., Savšek K., Jenko M., Čuš F. 2015. Spontana ali inokulirana alkoholna fermentacija? V: Vinarski dan 2015, Ljubljana, 19. november 2015. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 83-100

Žiberna I. 1992. Vpliv klime na lego in razširjenost vinogradov na primeru Srednjih Slovenskih goric. Geografski zbornik 32: 51-139

ZAHVALA

Za zanimivo temo diplomske naloge in strokovno vodenje se najlepše zahvaljujem mentorju doc. dr. Mojmirju Wondri. Za vse nasvete, popravke in natančno recenzijo iskrena hvala prof. dr. Lei Pogačnik.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi podatkov, gospe Zdenki Zupančič za pomoč pri delu v laboratoriju in Barbari Slemenik, univ. dipl. bibl. za tehnični pregled diplome.

Posebna hvala sošolcem Evi, Jerci, Jerici, Luku in Petru za vso pomoč med študijem, predvsem pa za lepe spomine na študijske dni.

Hvala Matevžu za popravke pri prevajanju, Jerneju, Maji in Vladki za vse spodbudne pogovore ter Nini in Manci za priganjanje h pisanju in moralno oporo.

Iz srca hvala staršema, ker sta ves čas verjela vame in me spodbujala h končanju študija.

Za konec hvala še Michaelu, za vso ljubezen, potrpežljivost in razumevanje.

PRILOGE

Priloga A: Izračun masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) iz relativne gostote d_{SE} pri 20 °C (Košmerl in Kač, 2007: 43)

2. decimalno mesto	3. decimalno mesto									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Koncentracija SE (g/L)									
1,00	0	2,6	5,1	7,7	10,3	12,9	15,4	18,0	20,6	23,2
1,01	25,8	28,4	31,0	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1
1,04	103,7	106,3	109,0	111,6	114,2	116,8	119,4	122,0	124,6	127,2
1,05	129,8	132,4	135,1	137,7	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3
Koncentracija SE (g/L)	4. decimalno mesto									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	0,3	0,5	0,8	1,0	1,3	1,6	1,8	2,1	2,3	

Opomba: 5. decimalno mesto d_{SE} ocenimo (OBVEZNO!)

Priloga B: Standardne raztopine galne kisline za pripravo umeritvene krivulje (Košmerl in Kač, 2007: 98)

Oznaka bučke	Volumen osnovne raztopine galne kisline (mL)	Končna koncentracija galne kisline v standardni raztopini (mg/L)
0	0	0 (slepi vzorec)
1	1	50
2	2	100
3	3	150
4	5	250
5	10	500